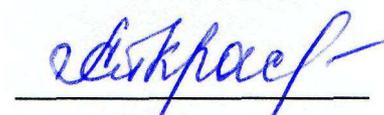


**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ЮЖНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АСТРАХАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи



КРАСИЛЬНИКОВА АЛЕКСАНДРА АНДРИАНОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВАЦИИ
РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК САМЦОВ РЫБ**

Специальность 06.04.01 – рыбное хозяйство и аквакультура

*Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:
доктор биологических наук
профессор Пономарев С.В.

АСТРАХАНЬ – 2015

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Отличия в строении сперматозоидов рыб	12
1.2 Некоторые факторы, влияющие на подвижность сперматозоидов рыб	29
1.3 Применение криотехнологий в рыбном хозяйстве и аквакультуре	33
1.4 О некоторых криозащитных веществах, применяемых в практике низкотемпературного консервирования	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК РЫБ	58
3.1 Исследование кристаллообразования жидкостей и определение объема внутриклеточной воды в сперматозоидах некоторых видов рыб	58
3.1.1 Кристаллообразование биологических жидкостей	58
3.1.2 Выделение свободной воды сперматозоидов рыб	65
3.2 Изменение объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от объема внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб	69
3.3 Исследование влияния объема замораживаемого материала на выживаемость репродуктивных клеток рыб после дефростации	74
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ОСОБЕЙ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ РУССКОГО ОСЕТРА	85
4.1 Оплодотворение нативной икры дефростированной спермой	85
4.2 Оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97

ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Повышенный интерес к криобиологии связан с нарастающим антропогенным влиянием на водные экосистемы, от которого особенно пострадали рыбы – наиболее крупная группа позвоночных животных. Такое воздействие резко ускорило темп преобразования водоёмов, что сказалось на сокращении числа видов, упрощении их популяционной структуры и в целом на биоразнообразии. Наблюдают и неуклонное сокращение численности рыб даже в крупных экосистемах. Особенно это заметно на таких видах, как осетровые, белорыбица (эндемик Каспийского моря), судак и др. (Матишов и др., 2010; Ходоревская, 2011; Васильева, Лозовская, 2012; Шишанова, 2013; Васильева, 2014; Иванов, Егорова, 2014). Если ранее русский осётр, севрюга и белуга, а также шип в Каспийском и Азовском бассейнах имели промысловое значение, то в настоящее время их вылов запрещен. Белуга и севрюга в этих водоёмах стали настолько редкими, что перешли в разряд исчезающих видов, а популяции русского осётра резко сократились (Лепилина и др., 2010; Васильева, 2012; Васильева и др., 2012; Смирнова и др., 2012; Ходоревская и др., 2014). К редким, в настоящее время, можно отнести шипа и аборигенный вид Каспийского моря - белорыбицу, численность которой снизилась до критически низкого уровня (Матишов и др., 2010; Абрудахманов и др., 2014; Досаева и др., 2014). Донская стерлядь занесена в Красную книгу РФ (Красная книга..., 2014).

Такое состояние с популяциями аборигенных, уникальных, исчезающих и хозяйственно-ценных видов рыб в южных морях России приводит к острой необходимости, наряду с восстановлением численности этих видов в естественных водоёмах, приступить к полномасштабному выращиванию их в искусственных условиях и развивать аквакультуру как агропромышленный сектор с применением низкзатратных и эффективных технологий, которые обеспечивают снижение промыслового давления на естественные популяции (Матишов и др., 2011; Матишов и др., 2013; Матишов, Пономарева, 2014).

Среди мероприятий по сохранению этого богатства, важное место принадлежит методам низкотемпературного консервирования сперматозоидов.

В настоящее время криотехнологии являются стратегически важными, в том числе антикризисными технологиями для решения проблем, связанных с сохранением генетического биоразнообразия рыб. Прогресс в разработке криотехнологий расширит сферу их использования в аквакультуре и рыбном хозяйстве, позволит поддерживать генетическое разнообразие промысловых стад рыб на должном уровне, стабилизировать их воспроизводство и тем самым способствовать устойчивому рыболовству, создаст предпосылки роста производства рыбы и других гидробионтов в морских и пресноводных хозяйствах аквакультуры. Организация низкотемпературных генных банков (НТГБ) позволит сформировать страховые фонды генетического материала рыб и гидробионтов на случаи резкого изменения климатических условий, а также техногенных и экологических катастроф (Цветкова и др., 2014).

Степень ее разработанности. В настоящее время в мировой практике исследований работы по сохранению и использованию замороженной спермы рыб ведутся достаточно широко. За последние десятилетия научные знания о специфике процедур криоконсервации спермы рыб существенно пополнились. Разработаны методы криоконсервации спермы более 250 видов различных рыб. Это, в основном, зарубежные разработки, которые успешно применяют в аквакультуре этих стран для сохранения гетерогенности генофонда таких рыб как форель, карповые, сиговые (Норвегия, Франция, Турция, Америка, Япония).

Существенный вклад в создание криотехнологий, пригодных для сохранения спермы рыб внесли украинские и российские ученые Л.И. Цветкова, Е.Ф. Копейка, С.И. Савушкина, Э.Н. Гахова, В.И. Ананьев, Б.Б. Дзюба, С.И. Дрокин, А.М. Тихомиров, А.А. Андреев совместно с их учениками и коллегами. Среди зарубежных учёных, успешно работавших по проблемам совершенствования методов криоконсервации спермы рыб для использования в искусственном воспроизводстве, генетике и селекции рыб, можно выделить Г.

Маисса (Maisse), Р. Билларда (Billard), Б. Харвея (Harvey), Ф. Ланштайнера (Lahnsteiner), О. Линхарта (Linhart), Е. Кабриты (Cabrita) С. Мартинес-Парамо (Martinez-Paramo), К. Рана (Rana), Т. Тиерша (Tiersh).

Однако в настоящее время качество дефростированной спермы еще не отвечает требованиям к воспроизводству, что связано с разнообразием морфофизиологической специфичности половых клеток рыб. Это является наиболее актуальным вопросом для дальнейшего совершенствования технологий криоконсервирования при сохранении генофонда. Методы криоконсервации репродуктивных клеток требуют совершенствования для увеличения выхода живых клеток после глубокого замораживания.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилось совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб и оценка качества криопотомства.

Поставленная цель определила решение следующих задач:

- исследовать кристаллообразование полостной жидкости эякулята и протоплазмы сперматозоидов;
- определить объем внутриклеточной жидкости в сперматозоидах некоторых видов рыб;
- проверить эффективность изменения объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от количества внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб;
- изучить влияние объемов замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации;
- установить возможность применения альтернативных способов подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию;
- осуществить оплодотворение нативной икры спермой, замороженной по усовершенствованной методике;

- дать сравнительную оценку качества предличинок, личинок и молоди рыб, полученных с использованием дефростированных репродуктивных клеток.

Научная новизна. В настоящей работе впервые выявлена зависимость необходимого количества протектора проникающего действия в криозащитных средах от объема внутриклеточной жидкости в сперматозоидах рыб. Установлена эффективность снижения объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитном растворе в зависимости от объема свободной внутриклеточной воды в составе протоплазмы сперматозоидов осетровых видов рыб и белорыбицы с целью повышения их выживаемости после криоконсервации. Впервые научно обосновано влияние объема замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации. Экспериментально доказано преимущество использования малых объемов замораживаемого материала при криоконсервации семенной жидкости самцов рыб. Впервые установлена возможность применения альтернативных способов подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию в виде тонких пленок. Дефростированной спермой, замороженной по усовершенствованной методике, проведено оплодотворение нативной икры русского осетра и получено жизнестойкое потомство. Проанализированы поведенческие реакции предличинок, личинок и молоди, полученных с использованием дефростированных репродуктивных клеток самцов русского осетра.

Теоретическая и практическая значимость. Диссертационная работа является экспериментально-практическим исследованием, результаты которого могут быть использованы для повышения выживаемости репродуктивных клеток самцов рыб при криоконсервации. Сохраненный генетический материал может быть задействован в технологическом процессе на рыбноводных заводах России. Результаты настоящей работы могут лечь в основу создания криобанка хозяйственно-ценных, аборигенных, уникальных и исчезающих видов рыб, которые могут быть использованы для пополнения численности популяций исчезающих видов рыб. Усовершенствованная методика криоконсервации

генетического и репродуктивного материала гидробионтов откроет большие возможности для создания новых экономически эффективных биотехнологий, сделает более результативными природоохранные мероприятия по спасению редких и исчезающих видов.

Положения, выносимые на защиту

1. Корректировка количества протектора проникающего действия в криозащитных средах для осетровых рыб и белорыбицы в зависимости от объема свободной внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб.
2. Зависимость объема замораживаемого материала и выживаемости сперматозоидов при криоконсервации.
3. Сравнительная оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди рыб, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб и по традиционной технологии.

Апробация результатов исследования.

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждались на Ежегодных конференциях студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН (г. Ростов-на-Дону, 2011-2014 гг.), II Региональной конференции ученых и инноваторов «Инно-Каспий» (г. Астрахань, 2011), Международной научной конференции «Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения» (г. Ростов-на-Дону, 2011), VI специализированной выставке «Образование – инвестиции в успех – 2011» при Министерстве образования и науки Астраханской области (г. Астрахань, 2011), региональной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых – вклад в инновационное развитие России» в рамках Международной научной школы для молодежи «Школа научно-технического творчества и концептуального проектирования» (г. Астрахань, 2011), инновационных молодежных конвентах Ростовской области (г. Ростов-на-Дону, 2011, 2012), Международной научной

конференции «Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ-2012» (г. Астрахань, 2012), Всероссийском конкурсе научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области химических наук и наук о материалах по направлению «Экология и ресурсосберегающее производство (в т. ч. мониторинг и прогноз состояния атмосферы и гидросферы)» (г. Казань, 2012), Всероссийской научной конференции профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета (г. Астрахань, 2012), VII Международной конференции «Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона» (г. Керчь, 2012), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2013, 2015), российской агро-промышленной выставке «Золотая осень - 2013» (г. Москва, 2013), научно-практической конференции с международным участием «Интенсивная аквакультура на современном этапе развития» (г. Махачкала, 2013), Международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (г. Сыктывкар, 2014), Международной научной конференции, приуроченной к пятилетию открытия базовой кафедры ЮНЦ РАН «Технические средства аквакультуры» в ДГТУ «Рациональное использование и сохранение водных биоресурсов (г. Ростов-на-Дону, 2014), Международной научной конференции научно-педагогических работников Астраханского государственного технического университета, посвященной 20-летию Астраханского государственного технического университета (г. Астрахань, 2014), Международной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей» (г. Ростов-на-Дону, 2014), Международной научной конференции научно-педагогических работников, посвященной 85-летию со дня основания Астраханского государственного технического университета (г. Астрахань, 2015), Международной научной конференции «World Aquaculture-2015» (г. Чеджу, Корея, 2015).

Исследования проведены в рамках Программы базового бюджетного финансирования ЮНЦ РАН по темам: «Биотехнологии аквакультуры – основа рационального природопользования в южных морях России» (№ госрег. 01201153670), «Оценка современного состояния, анализ процессов формирования водных биоресурсов южных морей России в условиях антропогенного стресса и разработка научных основ технологии реставрации ихтиофауны, сохранения и восстановления хозяйственно-ценных видов рыб» (№ госрег. 01201354245); программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок» по теме «Создание криобанка – репродуктора на основе новых биотехнологических методов глубокой заморозки клеток рыб для обеспечения промышленных и фермерских хозяйств» (№ госрег. 01201265589); соглашения №14.604.21.0129 по теме «Разработка методов и технологий мониторинга, управления и сохранения биологического разнообразия водных экосистем южных регионов России» (№ госрег. 114111940059, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0129) в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы».

Личный вклад автора в работу заключается в непосредственном выполнении экспериментальных работ по всем разделам диссертационной работы, обработке результатов, проведении анализа и обобщения полученной информации, сборе и анализе литературных данных по исследуемой проблеме, представлении результатов на научных мероприятиях в виде устных докладов и публикаций.

Публикации. По материалам исследований опубликована 21 научная работа, отражающая основное содержание диссертации, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, а также 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа представлена на 149 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы,

материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, содержит 49 рисунков и 5 таблиц. Список литературных источников содержит 362 наименования, в том числе 205 на иностранных языках.

Выражаю благодарность и признательность председателю Южного научного центра РАН академику Г.Г. Матишову, научному руководителю д.б.н., проф. С.В. Пономареву, особую благодарность и признательность к.б.н., вед.н.с. научно-исследовательской лаборатории «Криотехнологии в аквакультуре» АГТУ А.М. Тихомирову за помощь и советы на каждом этапе диссертационного исследования, заведующей отделом Водных биологических ресурсов бассейнов южных морей ЮНЦ РАН, д.б.н., проф. Е.Н. Пономаревой и сотрудникам лаборатории Водных биоресурсов и аквакультуры ЮНЦ РАН за советы, помощь и моральную поддержку в процессе подготовки диссертации, а также сотрудникам рыбоводных заводов Астраханской и Ростовской областей за содействие при сборе материала.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Отличия в строении сперматозоидов рыб

У большинства рыб, которым свойственно внешнее осеменение, сравнительно просто устроенный половой аппарат, состоящий из удлинённой формы семенников и проходящих по медиальному краю семяпроводов. Процесс сперматогенеза протекает в разных частях гонады с неодинаковой интенсивностью, что приводит к дифференцировке участков семенника по степени зрелости находящихся в них половых клеток. Такое распределение вызвано, прежде всего, особенностями анатомического строения гонады. Интенсивность процесса образования спермиальной жидкости, разжижающей спермии, возрастает по направлению от головного отдела семенника к хвостовому, что выражается в изменении плотности расположения спермиев в этих отделах (Турдаков, 1972).

У рыб концентрация спермиев в единице объема эякулята в основном выше, чем у животных с внутренним оплодотворением, например, у млекопитающих. Исключение составляют виды семейства осетровых (*Acipenseridae*), продуцирующие одновременно большое количество сравнительно жидких молок. А.С. Гинзбург (1968) отмечает, что в связи с этой особенностью у осетровых сперма хорошего качества имеет консистенцию цельного молока, а у лососевых и карповых похожа на густые сливки. Повышение концентрации спермиев в единице объема эякулята у рыб является, видимо, одним из приспособлений к достижению успешного оплодотворения в сложных условиях внешнего осеменения (рассеивание икры, быстрое снижение оплодотворяющей способности спермиев и оплодотворяемости икринок) (Турдаков, 1972).

Строение сперматозоидов рыб представляет большой интерес, так как конкретные морфологические различия между спермиями отражают различия в филогении и функциональных возможностях (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Afzelius, 1978; 2013; Jameison, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Hara, Okiyana,

1998; Psenicka et al., 2007; Psenicka et al., 2008; Lahnsteiner, Patzner, 2008; Gallego et al., 2013).

Спермии рыб имеют те же основные отделы, что и мужские половые клетки других животных: головку, среднюю часть и хвост. Головка является вместилищем структур – носителей наследственной информации, средняя часть и хвост – комплексом, позволяющим спермию приблизиться и проникнуть в яйцеклетку (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Jameison, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Afzelius, 2013).

Головка спермия представляет собой преобразованное в процессе гаметогенеза ядро сперматогониальной клетки и состоит в основном из дезоксирибонуклеопротеида (ДНП). Здесь содержится материал гаплоидного набора хромосом, в силу чего абсолютное количество ДНК в головке спермия вдвое ниже, чем в ядрах соматических клеток (Турдаков, 1972; Jameison, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Lahnsteiner, Patzner, 2008).

Ядерная часть головки спермия одета собственной мембраной и покрыта снаружи цитоплазматической оболочкой, непрерывно продолжающейся на среднюю часть и хвостовой отдел спермия (Турдаков, 1972; Afzelius, 1978; 2013).

Спермии рыб с внешним осеменением (двоякодышащие, хрящевые и костные ганоиды, большинство костистых) имеют, как правило, округлую головку, слабо развитую среднюю часть, состоящую из нескольких плотно прижатых к головке митохондриальных телец, и сравнительно длинный (до 50 мкм) хвост, обычно с хорошо выраженным концевым отделом (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Jameison, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Lahnsteiner, Patzner, 2008; Afzelius, 2013). Наряду с общими для примитивного типа чертами строения спермии костистых рыб имеют некоторые особенности: редукцию акросомы, неупорядоченность в расположении митохондриальных телец относительно осевой нити хвоста, вследствие чего осевая нить проходит через среднюю часть эксцентрически (Гинзбург, 1968; Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Jameison, 1991; Mattei, 1991; Lahnsteiner, Patzner, 2008; Afzelius,

2013). У видов рыб, перешедших к внутреннему осеменению, строение спермиев усложняется: головка приобретает удлиненную форму; значительно сильнее развивается средняя часть, образующая вокруг осевой нити хвоста мощный митохондриальный чехол; в большинстве случаев сохраняется копьевидная акросома. Это связано, по-видимому, со специфическими условиями встречи гамет в половых путях самки (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999).

У хрящевых рыб спермии очень крупные, имеют нитевидную форму. Общая длина спермия около 100 мкм, а длина головки – 30-40 мкм. Головка имеет акросому и ядро, среднюю часть и хвостовой жгут. Весь сперматозоид, от акросомы до жгутика, имеет штопорообразную форму. Спереди головка увенчана сравнительно небольшой (около 4 мкм) заостренной акросомой, имеющей несложное строение. Средняя часть содержит большое число митохондрий, расположенных рядом с продольным тяжем из электронно-плотного материала. В задней части митохондриальной муфты лежат две центриоли. От дистальной отходят аксонема с паттерном микротрубочек 9+2, окруженная двумя продольными тяжами, расположенными с боков от аксонемы и тянущимися по всей длине хвостового жгута. В средней части имеются гранулы гликогена. Спермии химеровых рыб близки по строению к спермиям акул и скатов, однако у них менее развиты ядро и средняя часть и не выявлена проксимальная центриоль. Таким образом, наиболее заметной особенностью спермиев хрящевых рыб, отличающей их от других многоклеточных животных, является расположение центриолей, которые удалены на значительное расстояние от ядра. Между ядром и центриолями расположены митохондрии, сгруппированные вокруг электронно-плотной оси. Аксонема начинается от дистальной центриоли и укреплена по бокам двумя (у акул и скатов) или одним (у химер) электронно-плотными периферическими тяжами (Дроздов, Иванков, 1999; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Afzelius, 2013). Отсутствие проксимальной центриоли в спермиях химер и наличие одного, а не двух тяжей в хвостовом отделе рассматривается как

апomorphicные (приобретенные позднее) признаки (Jameison, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991).

Сперматозоиды хрящевых рыб отличаются от костистых рыб тем, что имеют акросому (Гинзбург, 1968; Cherr, Clark, 1984; Lahnsteiner et al., 2004; Psenicka et al., 2006; Psenicka et al., 2007; Psenicka et al., 2008; Psenicka et al., 2010; Psenicka et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b; Hated et al., 2012; Linhartova et al., 2013a; 2013b; Alavi et al., 2014), более длительный период подвижности (Toth., 1997; Billard et al., 1999; Cosson et al., 2000; Alavi et al., 2004) и содержат акрозин (Ciereszko et al., 1994; Ciereszko et al., 1996; Ciereszko et al., 2000; Piros et al., 2002; Psenicka et al., 2009). Акрозин (сериновая протеаза) – это фермент, который образуется акросомным комплексом спермия, участвует в процессе проникновения спермия в яйцо через вителлиновый слой *zona pellucida* (в самом спермии акрозин находится в проэнзиматической форме и неактивен) (Арефьев, Лисовенко, 1995; Шмитова и др., 2014; Pinart et al., 2015).

На рисунке 1 представлено строение сперматозоида осетровых рыб.

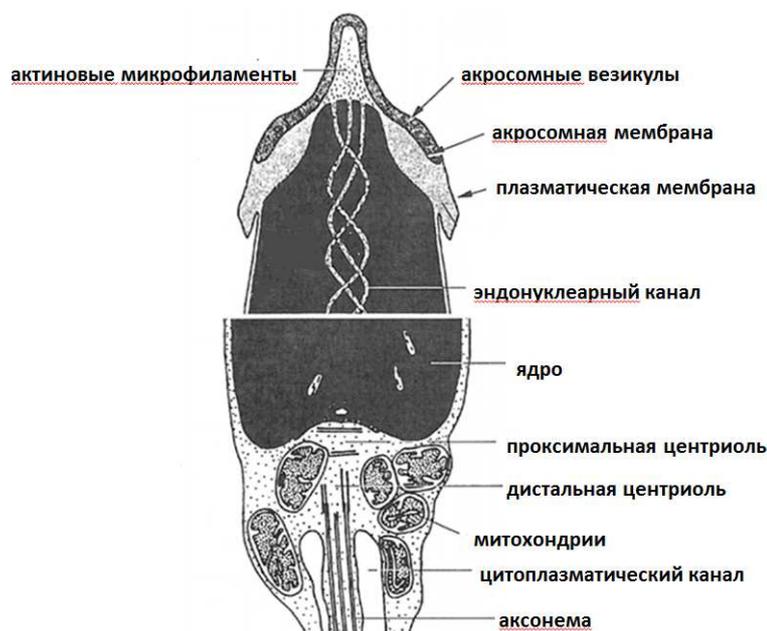


Рисунок 1 – Строение сперматозоида осетровых рыб
(Cherr, Clark, 1984; Jamieson, 1991)

Спермии осетровых видов рыб имеют продолговатую головку с передней частью, называемой акросомной, цилиндрическую среднюю часть с центриолярным комплексом, и хвост со структурой микротрубочек (фибрилл) 9+2 (Гинзбург, 1968; Cherr, Clark, 1984; Jamieson, 1991; DiLauro et al., 1998, 1999, 2000, 2001; Psenicka et al., 2007; Alavi et al., 2008; Psenicka et al., 2008; Psenicka et al., 2009; Psenicka et al., 2010; Psenicka et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b; Hatem et al., 2012; Afzelius, 2013; Linhartova et al., 2013a; 2013b; Alavi et al., 2014).

На рисунке 2 схематично изображены сперматозоиды некоторых осетровых видов рыб.

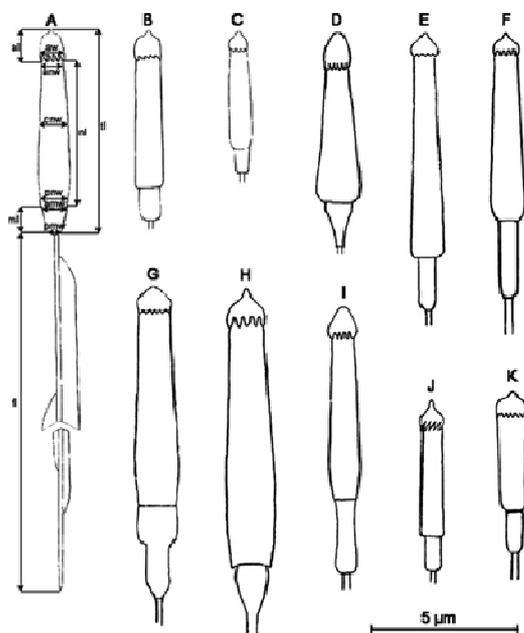
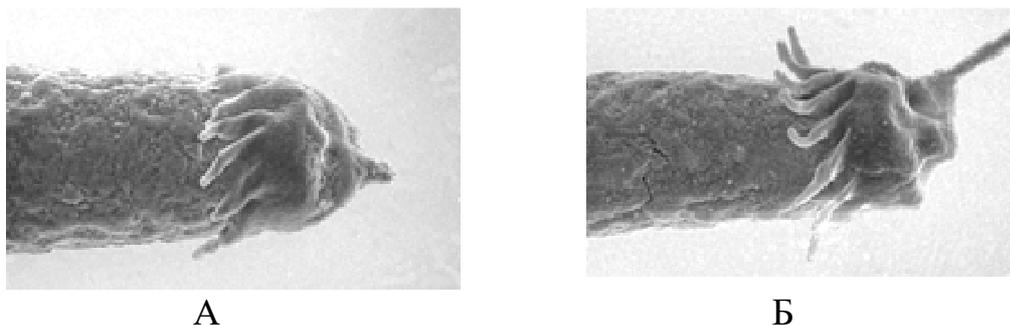


Рисунок 2 – Сперматозоиды некоторых осетровых видов рыб

(A) Сибирский осетр *A. baerii* (Psenicka et al., 2007), (B) Веслонос *Polyodon spathula* (Psenicka et al., 2007), (C) Стерлядь *A. ruthenus* (Psenicka et al., 2007), (D) Китайский осетр *A. sinensis* (Xu and Xiong, 1988; Wei et al., 2007), (E) Тупорылый осетр *A. brevirostrum* (DiLauro et al., 1999), (F) Озерный осетр *A. fulvescens* (DiLauro et al., 2000), (G) Севрюга *A. stellatus* (Гинзбург, 1977), (H) Белый осетр *A. transmontanus* (Cherr, Clark, 1984; 1985), (I) Колхидский осетр *A. gueldenstaedti colchicus* (Гинзбург, 1968), (J) Белый лопатонос *Scaphirhynchus albus* (DiLauro et al., 2001), (K) Атлантический осетр *A. oxyrhynchus* (DiLauro et al., 1998).

Важной составной частью головки спермия является акросома, способствующая преодолению оболочки яйца при оплодотворении (Турдаков, 1972; Cherr et al., 2005; Psenicka et al., 2008; Psenicka et al., 2009; Psenicka et al., 2010; Psenicka et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012 b, Afzelius, 2013; Linhartova et al., 2013a; 2013b; Alavi et al., 2014). На рисунке 3 представлены фотографии акросомы до и после активации сперматозоида водой.



А
Б
Рисунок 3 – Акросома сибирского осетра до (А) и после (Б) активации сперматозоида (Psenicka et al., 2010)

У рыб, как и у других животных в образовании акросомы принимает участие аппарат Гольджи (Турдаков, 1972; Nicander, 1970; Psenicka et al., 2010). У спермиев хрящевых ганоидов акросома имеет вид плоского колпачка, плотно прилежащего к передней части головки (Турдаков, 1972; Psenicka et al., 2008; Psenicka et al., 2009; Psenicka et al., 2011; Afzelius, 2013; Linhartova et al., 2013a; 2013b). У большинства костистых рыб акросома отсутствует (Турдаков, 1972; Mattei, 1991; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Hara, Okiyana, 1998; Lahnsteiner, Patzner, 2008). Исключение составляют спермии угря *Anguilla anguilla*, на переднем конце головки которых образуется копьевидный вырост, напоминающий акросому (Турдаков, 1972; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Gallego et al., 2014).

Отсутствие акросомы у спермиев является характерной чертой костистых и отличает их от большинства спермиев примитивного типа. Как полагают (Гинзбург, 1968), редукция акросомы у костистых стала возможной благодаря тому, что у них спермий при оплодотворении вступает в непосредственный

контакт с поверхностью ооплазмы в глубине микропилярного канала. В результате отпадает необходимость в существовании аппарата, с помощью которого спермий у других видов животных преодолевает барьер – проницаемую для него цитоплазматическую оболочку яйца (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Jamieson, 1991; 1999; 2009).

Средняя часть спермиев состоит из комплекса митохондриальных телец и двух центриолей (проксимальной и дистальной) и вакуолей (Гинзбург, 1968; Cherr, Clark, 1984; Jamieson, 1991; 1999; 2009; DiLauro et al., 1998, 1999, 2000, 2001; Psenicka et al., 2009; Afzelius, 2013). Как и в других клетках, митохондрии спермия являются генераторами энергии, обеспечивающими функционирование аппарата движения (Турдаков, 1972; Alavi et al., 2012a, b; Afzelius, 2013; Alavi et al., 2014). Количество митохондриальных компонентов может отличаться как между осетровыми видами рыб (DiLauro et al., 1998; 1999; 2000; 2001), так и между костистыми (Linhart et al., 1991). Митохондрии являются источником для генерации АТФ в процессе подвижности сперматозоидов (Tsvetkova et al., 1996; Billard et al., 1995; 2000; Afzelius, 2013).

В наибольшей степени митохондриальный чехол развит у спермиев с внутренним осеменением, особенно у пластинчатожаберных и цельноголовых (Турдаков, 1972). У хрящевых ганоидов (осетра, белуги, севрюги) митохондриальный комплекс равномерно окружает участок осевого стержня, ограниченный спереди проксимальной центриолью, а сзади дистальным центриолярным кольцом (Гинзбург, 1968; Psenicka et al., 2009; Psenicka et al., 2010; Psenicka et al., 2011). Вакуоли, состоящие из липидной капли, часто наблюдаются в области средней части сперматозоидов различных видов рыб (Afzelius, 1978), и были обнаружены у многих осетровых (DiLauro et al., 1999), кроме озерного осетра *A. fulvescens* (DiLauro et al., 2000).

Большинство видов костистых рыб с внешним осеменением имеют спермии с довольно слабо развитой средней частью, которая состоит из нескольких шаровидных митохондриальных телец и двух центриолей. Количество

митохондриальных телец варьирует у разных видов от 1 у окуня до 20 и более у золотой орфы *Idus melanotus*, однако их число обычно не превышает 4-5 (Турдаков, 1972; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Afzelius, 2013).

У лососевых рыб митохондриальный комплекс располагается в углублении заднего отдела головки (Гинзбург, 1968). Чаще всего это округлое образование плотно прилежит к заднему отделу головки спермия (Турдаков, 1972; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Afzelius, 2013).

Митохондриальный комплекс покрыт цитоплазматической мембраной. У спермиев карася *Carassius auratus* она образует складку, отделяющую митохондрии от участка осевой нити хвоста, к которому они прилежат. Поэтому митохондриальные тельца не имеют непосредственного контакта с фибриллярным комплексом осевой нити (Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Jamieson, 1991; 1999; 2009).

Хвостовой отдел начинается сразу же за средней частью спермия и состоит из осевой нити и покрывающего ее чехла. Осевая нить берет начало от дистальной центриоли. Осевая нить образована тонкими фибриллами. Фибриллярный комплекс хвоста построен по общей схеме и состоит из двух одинаковых сравнительно более мощно развитых нитей (М-фибриллы) и окружающих их в виде кольца девяти двойных нитей (L-фибриллы) (Гинзбург, 1968; Cherr, Clark, 1984; DiLauro et al., 1998, 1999, 2000, 2001; Psenicka et al., 2007; Alavi et al., 2008; Psenicka et al., 2009; Hatef et al., 2012; Linhartova et al., 2013), в соответствии с рисунком 4.

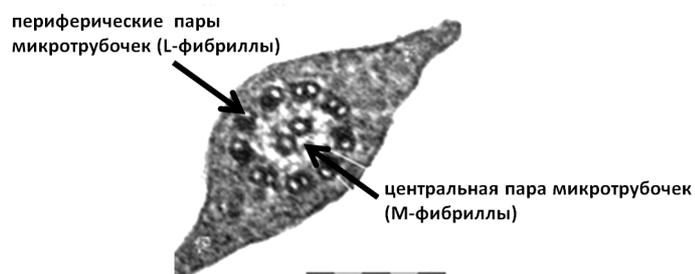


Рисунок 4 – Хвост сперматозоида осетровых рыб в поперечном разрезе (Psenicka et al., 2007; Linhartova et al., 2013a)

Так в основном устроен хвост сперматозоидов большинства видов рыб, за исключением европейского угря (*Anguilla anguilla* L., 1758) (Todd, 1976; Gibbons et al., 1985) и морского угря (конгера) (*Conger myriaster* Brevoort, 1856) (Okamura, Motonobu, 1999), которые не имеют центральной пары микротрубочек, у них только 9 пар периферических фибрилл.

Составляющие осевую нить хвоста фибриллы могут проходить по всей длине, например, у спермиев леща *Abramis brama*. В этом случае хвост на всем протяжении имеет одинаковую толщину. У большинства же видов рыб (щука, гуппи, меченосец) отдельные фибриллы прерываются, не достигая окончания хвостового отдела, вследствие чего происходит утончение хвоста, либо (у осетра, сельди *Caspialosa tanaica*, кижуча *Oncorhynchus kisutch* и др.) образуется хорошо выраженная концевая часть (Гинзбург, 1968).

Характерной особенностью сперматозоидов осетровых рыб являются боковые складки (ребра или гребни), образующиеся плазматической мембраной и расположенные вдоль большей части жгутика, в соответствии с рисунком 5.

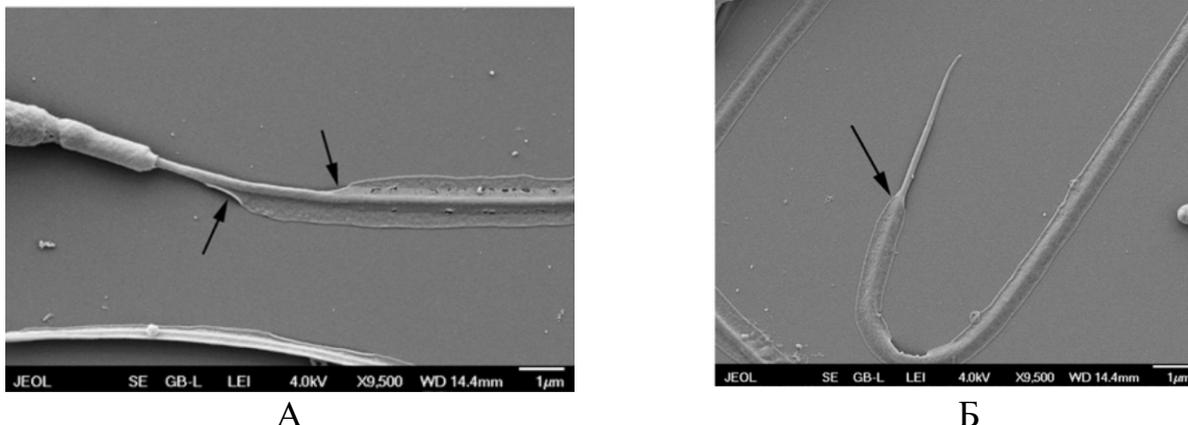


Рисунок 5 – Боковые складки вдоль хвоста сперматозоида белуги

А – начало хвоста, Б – конец хвоста (Linhartova et al., 2013a)

Такие боковые складки у сперматозоидов осетровых отмечают многие ученые: у белого лопатоноса (DiLauro и соавт., 2001), китайского осетра (Wei et al., 2007), сибирского осетра (Psenicka et al., 2007), персидского осетра (Hatef et al., 2011), стерляди (Psenicka et al., 2009), белуги (Linhartova et al., 2013a; b).

Складки появляются преимущественно вдоль горизонтальной плоскости, и способствуют повышению гидродинамического эффекта, т.е. эффективности распространения волны движения спермия (Cosson et al., 2000; Psenicka et al., 2008; Alavi et al., 2009; Psenicka et al., 2011; Gillies et al., 2013).

Спермии высших костистых рыб (Teleostei) обладают одним характерным признаком, отличающим их ото всех других позвоночных животных, – отсутствием акросомы. Помимо простых одножгутиковых спермиев у костистых рыб встречаются и безжгутиковые спермии. Сперматозоиды костистых рыб обычно имеют овальную или шаровидную головку диаметром около 3 мкм. В средней части спермия имеется одна кольцевая митохондрия, окружающая две центриоли – проксимальную и дистальную. От последней отходит хвостовой жгут длиной около 50 мкм. Жгутик обычно образован лишь аксонемой, без дополнительных структур. Характерным примером таких спермиев являются спермии тихоокеанских лососей, в частности чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* (рисунок 6) (Дроздов, Иванков, 1999; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Hara, Okiyama, 1998; Afzelius, 2013).

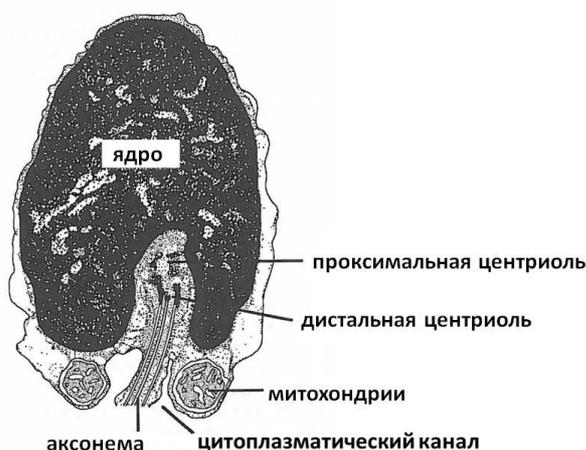


Рисунок 6 - Сперматозоид чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792 (Zirkin, 1975; Jamieson, 1991; Mattei, 1991)

Спермии представителей отряда угреобразных (*Anguilliformes*) имеют весьма специфическую морфологию. Ядро спермия вытянуто по оси,

перпендикулярной оси жгутика. Единственная митохондрия и две центриоли расположены друг напротив друга на противоположных полюсах ядра. Проксимальная центриоль удлинена. От дистальной центриоли отходит жгутик с паттерном трубочек 9+0. От центриолей отходит исчерченный корешок, который формирует выпячивания на поверхности спермия (Jamieson, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991; Asturiano et al., 2004; Gallego et al., 2014). На рисунке 7 представлен сперматозоид европейского угря.

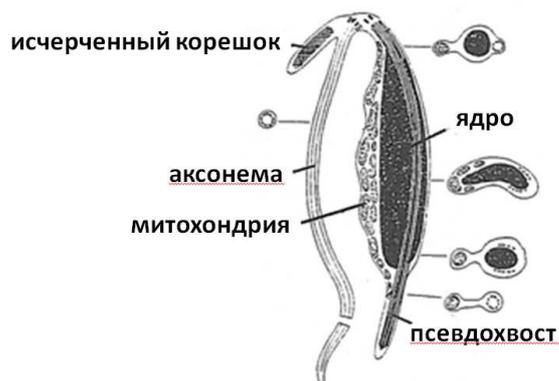


Рисунок 7 – Сперматозоид европейского угря *Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758 (Gibbons et al., 1983; Jamieson, 1991)

Спермии семейств Сельдевые *Clupeidae* и Анчоусовые *Engraulidae* имеют два апоморфных признака: одну кольцеобразную митохондрию и внутритрубочковую дифференциацию А-микротрубочек аксонемальных дуплетов 1,2,6 и 7 (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). На рисунке 8 представлен сперматозоид европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1758.



Рисунок 8 - Сперматозоид европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1758 (Mattei et al., 1981; Jamieson, 1991; Mattei, 1991)

Для спермиев ряда семейств (Щуковые *Esocidae*, Лососевые *Salmonidae*, Корюшковые *Osmeridae* и Серебрянковые *Argentinidae*) характерно расположение жгутика в латеральной части ядра (Jamieson, 1991; 1999; 2009; Mattei, 1991). На рисунке 9 представлен сперматозоид щуки обыкновенной.

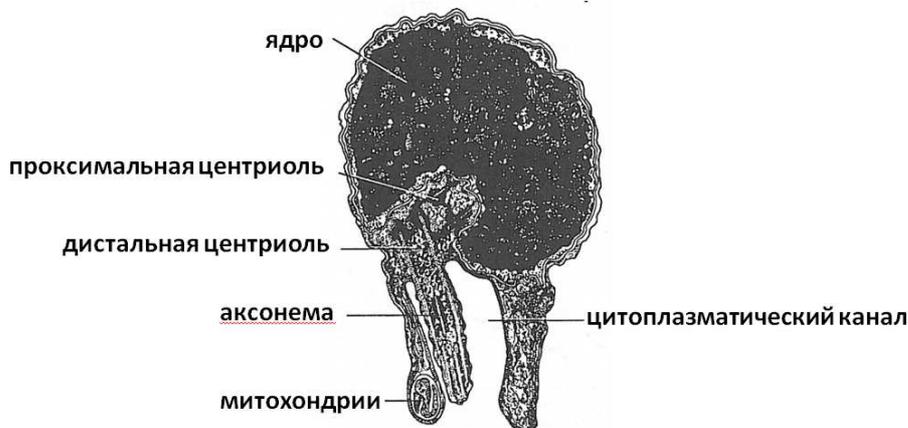


Рисунок 9 – Сперматозоид щуки обыкновенной *Esox lucius* Linnaeus, 1758 (Stein, 1981; Jamieson, 1991; Mattei, 1991)

В семействах Ариевые *Ariidae*, Иctalуровые, Кошачьи сомы *Ictaluridae* и Электрические сомы *Malapteruridae* спермии двужгутиковые (Leung, 1987). На рисунке 10 представлен сперматозоид канального сома.

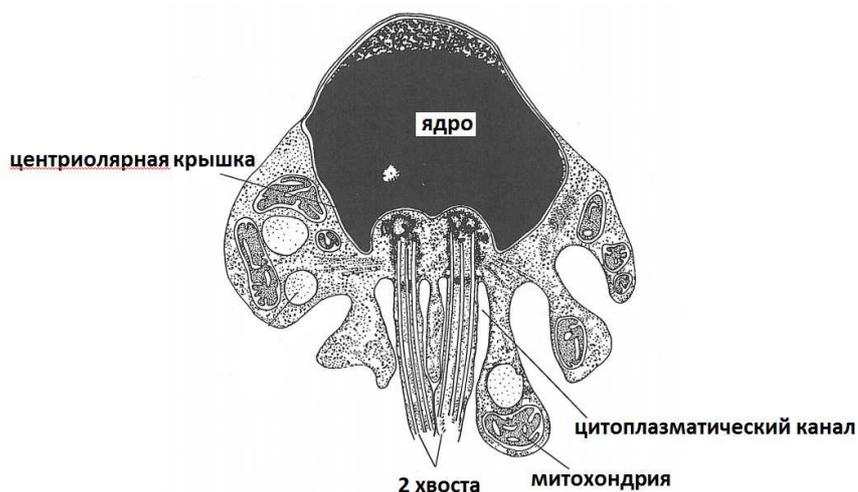


Рисунок 10 – Сперматозоид канального сома *Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818 (Poirier, Nicholson, 1982; Jamieson, 1991)

У подотряда Серебрянководных *Argentinoidei* и семейства Лососевые *Salmonidae* митохондрии сливаются в одну, которая либо сферическая и лежит с боку от жгутика (*Searsia*, *Xenodermichthus*, *Hucho*), либо кольцевая, окружающая жгутик (*Bajacalifornia*, *Salmo*, *Oncorhynchus*) (Дроздов, Иванков, 1999).

У представителей некоторых отрядов батрахообразных (*Batrachoidiformes*) и присоскообразных (*Gobiesociformes*) встречаются двужгутиковые спермии. У обыкновенной рыбы-присоски (одноцветная рыба-присоска, или обыкновенная рыба-уточка) *Lepadogaster lepadogaster* Bonnatere, 1788 из отряда присоскообразные *Gobiesociformes* особая структура впереди ядра интерпретируется как псевдоакросома (Mattei, 1991) (рисунок 11).

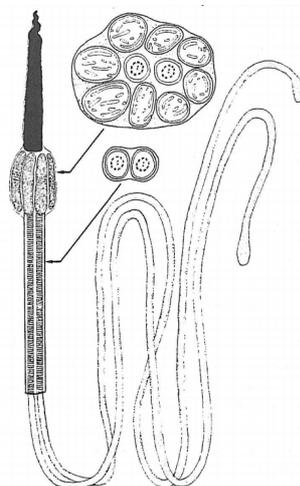


Рисунок 11 – Сперматозоид обыкновенной рыбы-присоски *Lepadogaster lepadogaster* Bonnatere, 1788 (Mattei С., Mattei Х., 1978; Jamieson, 1991)

Акросомоподобная структура описана также в сперматидях *Neoceratias* (рисунок 12), но в зрелых спермиях она тем не менее отсутствует (Jespersen, 1983).

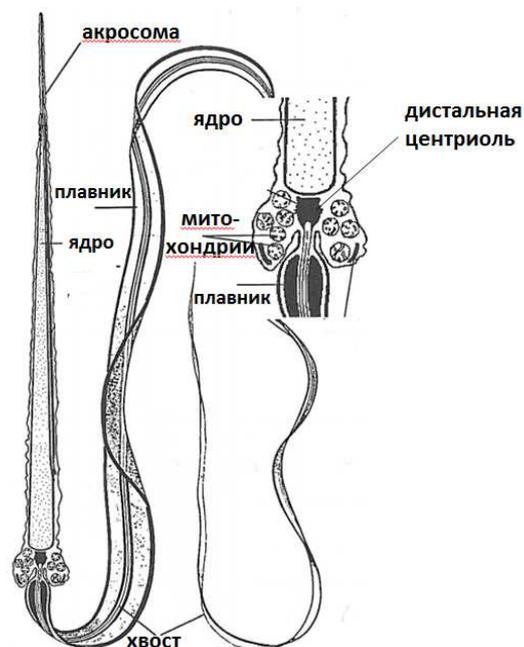


Рисунок 12 – Схематично изображенный сперматозоид *Neoceratias fosteri* Krefft, 1870 (Jespersen, 1971; Mattei, 1991)

У видов из родов Ошибни *Ophidion*, Неоцератии *Neoceratias* и Лепидогастеры *Lepadogaster*, для которых характерно внутреннее осеменение, хотя они принадлежат к разным отрядам и разным семействам, спермии имеют вытянутое ядро со штопорообразной передней частью (Mattei, 1991).

Представители отрядов карпозубообразных *Cyprinodontiformes*, атериноподобных *Atheriniformes* и сарганоподобных *Beloniformes* чаще всего имеют спермии простого строения с округлой головкой и несколькими митохондриями в небольшой средней части (Дроздов, Иванков, 1999), которые могут быть расположены асимметрично, например как у *Aphyosemion splendopleure* (рисунок 13А) и других представителей семейства Карпозубообразные *Cyprinodontidae*; или многочисленными мелкими митохондриями, как у *Characodon lateralis* (рисунок 13Б) (Grier et al., 1981).



Рисунок 13 – Схематично изображенные сперматозоиды Афиосемиона великолепного *Aphyosemion splendopleure* Brunning 1929 (А) и Краснобрюхого харакодона *Characodon lateralis* Gunther, 1866 (Б) (Mattei, 1991)

У рыб с внутренним осеменением, например, из семейства Пецилиевые *Poeciliidae*, спермии с вытянутой головкой и хорошо развитой средней частью (Mattei, 1991) (рисунок 14).

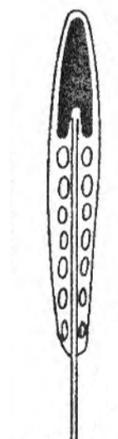


Рисунок 14 – Схематично изображенные сперматозоиды группы *Poecillia reticulata* W. K. H. Peters, 1859 (Mattei, 1991)

Однако внутреннее осеменение не всегда коррелирует с формированием вытянутой головки спермия и гипертрофией средней части за счет увеличения числа митохондрий, как, например, у представителей семейства Гудиевые *Goodeidae* (Mattei, 1991).

Один из самых многочисленных надотрядов костистых рыб – перкоидные (Percomorpha), имеет не очень четкие границы и еще не очень разработанную систематику. Однако их спермии чаще всего имеют простую морфологию. Отмечаются некоторые вариации в расположении центриолей, форме ядра и числе митохондрий, окружающих жгутик. Но в некоторых отрядах имеются весьма значительные отклонения в структуре спермиев. У *Cephalocanthus volitans* (рисунок 15А) (из отряда Долгоперообразные *Dactylopteriformes*) спермии с асимметричным ядром и средней частью. У скорпенообразных (отр. *Scorpaeniformes*) встречается внутреннее осеменение, но спермии у них могут быть двух типов: с сильно вытянутым ядром и средней частью, как у *Oligocottus maculosus* (рисунок 15Б) из сем. *Cottidae*, или со слабо удлинненным и почти сферическим ядром и маленькой средней частью, как у *Sebasticus marmoratus* (рисунок 15В) (Mizue, 1968). Следует отметить, что у представителей семейства *Cottidae* вариабельность размеров и морфологии спермиев вообще очень высокая (Hann, 1930).

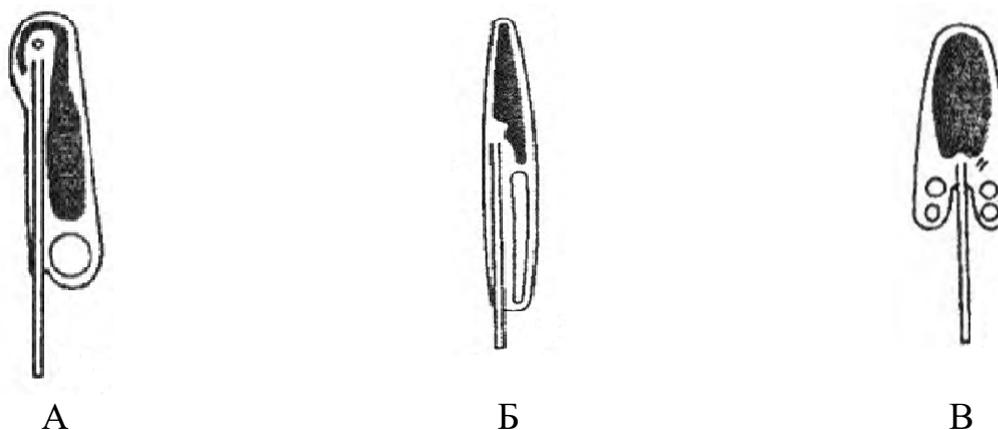


Рисунок 15 – Схематично изображенные сперматозоиды *Cephalocanthus volitans* (А); *Oligocottus maculosus* (Б); *Sebasticus marmoratus* (В) (Mattei, 1991)

Наиболее крупным отрядом среди всех позвоночных животных является отряд окунеобразных (*Perciformes*), который включает более 170 семейств (Nelson, 1984). Среди окунеобразных простая форма спермиев встречается, но не слишком часто. Небольшие модификации этой формы спермиев у семейств

Парусниковые или Копьерылые *Istiophoridae*, Султанковые *Mullidae*, Помацентровые или Рифовые рыбы *Pomacentridae*, Цихловые *Cichlidae* и Перкофисовые *Percophididae*. На рисунке 16 представлен сперматозоид нильской тиляпии.

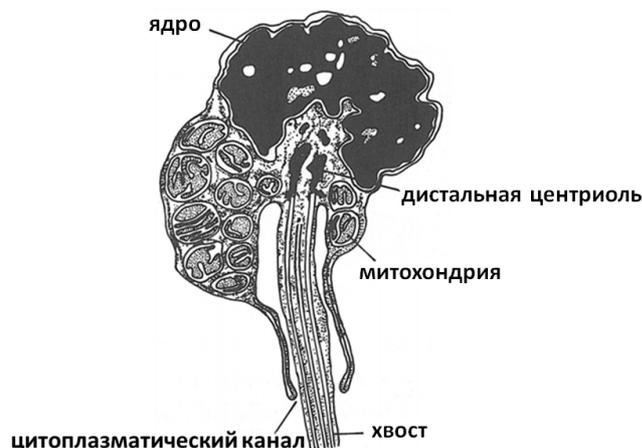


Рисунок 16 – Сперматозоид нильской тиляпии *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Guha et al., 1988; Jamieson, 1991)

Спермии с одной митохондрией характерны для семейств Собачковые *Blenniidae*, Клиновые или Чешуйчатые собачки *Clinidae*, Бычковые *Gobiidae* и Спаровые или Морские караси *Sparidae*. В семействе Эмбиотоковые или Живородковые *Embiotocidae* имеется внутреннее осеменение, и для его представителей характерны спермии с удлинённым ядром и хорошо развитой средней частью с крупными митохондриями. Семейство Апогоновые или Кардиналковые *Apogonidae* является единственным среди окунеобразных, в котором встречаются двужгутиковые спермии (Mattei, 1991).

Общая структура спермиев не всегда является единой для подотряда или даже для семейства (Baccetti, 1986; Jamieson, 1991; 1999; 2009; Hara, Okiyama, 1998; Lahnsteiner, Patzner, 2008). Так, например, в семействе Собачковые *Blenniidae* встречаются спермии со сферической, дискоидальной или вытянутой головкой, с числом митохондрий от 1 до 6 (Boisson et al., 1967). К. Маттеи (Mattei, 1991) выделяет особый окунеобразный тип спермиев, для которого характерно

овальное ядро с впячиванием в базальной части, напротив которого лежат две центриоли. Основание ядра параллельно оси жгутика. Несколько митохондрий окружают переднюю часть жгутика. Такой тип спермиев встречается в 29 из 41 изученных семейств окунеобразных (Mattei, 1991).

Таким образом, на основании морфологии спермиев можно четко говорить о монофилии хрящевых рыб (Chondrychthyes). Также ясно отделяются друг от друга оба подкласса хрящевых рыб – пластиножаберные (Elasmobranchii) и цельноголовые или слитночерепные (Holosephali). Представители класса костных рыб (Osteichthyes) демонстрируют очень разнообразные спермии. Наиболее примитивные, такие, как кистеперые (Crossopterygomorpha), двоякодышащие (Dipneustomorpha), многоперообразные (Polypteriformes), осетрообразные (Acipenseriformes), панцирнικοобразные (Lepisosteiformes), амиеобразные (Amiiformes), обладают достаточно специфическими типами спермиев, характеризующими эти таксоны (Дроздов, Иванков, 1999).

1.2 Некоторые факторы, влияющие на подвижность сперматозоидов рыб

Спермии рыб, неподвижные в эякуляте, приходят в активное движение при контакте с водой (Гинзбург, 1968; Турдаков, 1972; Stoss, 1983; Morisawa M., Morisawa S., 1990; Cosson, 2010; Bondarenko, Cosson, 2011; Sejko et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a; Dzuba, Cosson, 2014; Prokopchuk et al., 2015). Активированные водой спермии быстро набирают максимальную скорость, затем скорость движения спермиев быстро снижается (Турдаков, 1972; Cosson, 2013; Alavi et al., 2014; Cosson, Prokopchuk, 2014a; b; Sanches et al., 2014). Причина такого снижения объясняется ограниченностью энергетических ресурсов спермиев рыб и неблагоприятным влиянием на половые клетки условий окружающей среды (Гинзбург, 1968; Турдаков, 1972; Дроздов, Иванков, 1999; Linhart, 2008; Alavi et al., 2012a, 2012b; Dzuba et al., 2012; Cosson et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a). Характер падения оплодотворяющей способности во

многим зависит от концентрации спермиев в суспензии. При увеличении разбавления эякулята водой активность спермиев усиливается. Это явление получило название «эффекта разбавления» - *dilution effect* (Турдаков, 1965; Турдаков, 1972). В густой суспензии, под влиянием быстрого накопления углекислоты, снижения содержания кислорода и соответствующего изменения реакции среды движение спермиев быстро затормаживается. Это иногда приводит к падению оплодотворяющей способности спермиев по сравнению с суспензией, в которой на единицу объема приходится меньшее количество половых клеток (Турдаков, 1965; Гинзбург, 1968). В других случаях снижение активности спермиев рыб при малых разбавлениях и увеличенном содержании их в единице объема суспензии приводит к противоположному результату – повышению срока сохранения спермиями оплодотворяющей способности.

Определение оптимальной концентрации спермиев является важным условием успешного проведения искусственного осеменения. Недостаточное или чрезмерное количество спермы значительно снижает результаты оплодотворения и инкубации икры (Персов, 1953).

Скорость реакций, лежащих в основе механизма обмена и движения спермиев животных, находится в прямой зависимости от температурных условий. Эту особенность используют, в частности, при длительном хранении эякулятов спермы в условиях низких температур. Одновременно с температурой меняется характер, скорость и продолжительность движения спермиев (Rikmenspoel, 1962; Dujin, Liepor, 1966; Dujin, 1967; Branham, 1969; Турдаков, 1971; Alavi, Cosson, 2005b; Linhart, 2008; Valdebenito et al., 2011; Baeza et al., 2013; Peñaranda et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a).

Пределы осмотического давления, при которых спермии сохраняют подвижность и оплодотворяющую способность, у разных видов животных существенно отличаются (Morisawa, Suzuki, 1980; Morisawa et al., 1983; Gallis et al., 1991; Linhart et al., 1995; Linhart et al., 2002; Linhart et al., 2003a, b; Alavi et al., 2004a, 2004b; Alavi, Cosson, 2005a; Alavi, Cosson, 2006; Linhart et al., 2006; Alavi et

al., 2009; Alavi et al., 2011; Dzuba et al., 2011; Valdebenito et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b; Liu et al., 2015). В целом, у животных с внешним осеменением спермии обладают более высокой устойчивостью к изменениям солености окружающей среды (Bishop, 1961; Милованов, 1962; Cosson et al., 1999; Linhart, 2008; Valdebenito et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b), что является, как полагают, следствием приспособления к значительным колебаниям внешних условий при осеменении.

Уровень солеустойчивости спермиев может существенно варьировать у рыб, обитающих в сходных условиях. Это обусловлено неодинаковой проницаемостью поверхностных структур спермиев для воды и солей у различных видов рыб (Турдаков, 1972; Cosson et al., 1999; Alavi, Cosson, 2006; Linhart, 2008; Gallego et al., 2011; Cosson, 2012; Dzuba et al., 2012; Beirão et al., 2013).

Реакция спермиев морских видов рыб на изменение осмотического давления окружающей среды отличается от реакции спермиев пресноводных видов рыб. Первые не способны активироваться в гипотонических растворах соленостью ниже 4-6‰ и обладают более высокой стойкостью к повышению солености среды. Наиболее благоприятной средой для движения спермиев обеих групп рыб являются солевые растворы, осмотическое давление которых заметно ниже осмотического давления их внутренней среды (Турдаков, 1972; Alavi, Cosson, 2006; Alavi et al., 2008; Valdebenito et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b; Pérez et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a; Liu et al., 2015).

Известную роль в увеличении продолжительности движения спермиев рыб в определенной области осмотического давления солевых растворов играет снижение энергетических затрат половыми клетками на осмотическую работу (Турдаков, 1972; Cosson, 2012; Cosson, 2013; Cosson et al., 2013). Существенное значение имеет протективное действие этих растворов на спермии (Гинзбург, 1968). В таких средах разрушение хвостов и головок у спермиев происходит значительно медленнее, чем в пресной воде. Сохранение структурной

целостности аппарата движения позволяет утратившим подвижность и оплодотворяющую способность спермиям при определенных условиях постепенно восстанавливать энергетические запасы и приобретать способность к повторной активации и оплодотворению икринок (Gallis et al., 1991; Alavi, Cosson, 2006).

Продолжительность движения и времени жизни спермиев в гипертонических растворах сокращается, в результате снижения протективных свойств среды, обезвоживания спермиев и повреждения их двигательного аппарата (Турдаков, 1972; Cosson et al., 1999; 2013; Cosson, 2012; Liu et al., 2015).

Зависимость подвижности спермиев от величины осмотического давления в растворах электролитов и неэлектролитов носит в целом сходный характер и позволяет заключить, что осмотический фактор является одним из ведущих в определении продолжительности движения и характера активации спермиев рыб (Alavi, Cosson, 2006; Gallego et al., 2011; Valdebenito et al., 2011; Dzuba et al., 2011; Alavi et al., 2012a, 2012b; Prokopchuk et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a; Liu et al., 2015).

Большое количество данных свидетельствует о значительной роли химического состава раствора (соотношения в нем солей) в определении характера подвижности спермиев (Morisawa, Suzuki, 1980; Morisawa et al., 1983; Gallis et al., 1991; Alavi et al., 2004a, 2004b; Alavi, Cosson, 2005a; Li et al., 2005; Alavi, Cosson, 2006; Alavi et al., 2009; Alavi et al., 2011; Dzuba et al., 2011; Gallego et al., 2011; Dzuba et al., 2012; Alavi et al., 2012a, 2012b; Cosson, Prokopchuk, 2014a; Liu et al., 2015).

Спермии рыб активируются в довольно широком диапазоне pH. В кислой среде они обычно неподвижны, быстро агглютинируют и разрушаются. Пороговая концентрация водородных ионов, при которой спермии приходят в движение, варьируют в пределах от 5,0 до 7,0. С повышением щелочности среды вплоть до крайних значений (pH = 12-13) наблюдается увеличение активности и

продолжительности подвижности половых клеток (Турдаков, 1972; Cosson, Linhart, 1996; Ingermann et al., 2002; Alavi, Cosson, 2005b; Valdebenito et al., 2011).

1.3 Применение криотехнологий в рыбном хозяйстве и аквакультуре

Один из побочных эффектов развития цивилизации – обеднение генофонда и в конечном счете гибель и исчезновение многих видов растений и животных. Пространства многих природных экосистем стремительно сокращаются, изменяются и разрушаются места обитания, уменьшается их численность и разнообразие. Эти процессы приняли особенно угрожающие масштабы с конца XX в. (Бапсанова, 2012; Амстиславский и др., 2014).

В настоящее время важнейшей задачей является сохранение генофонда редких и исчезающих популяций и видов рыб, особенно тех, которые представляют практический интерес для увеличения уловов рыб в естественных водоемах или для введения их в аквакультуру как перспективных объектов разведения (Ананьев, Манохина, 2007; Ананьев, 2013а, 2013б).

Одним из способов рационализации искусственного воспроизводства рыб является содержание ремонтно-маточных стад на рыбоводных предприятиях. Однако производители рыб для воспроизводства завозятся произвольно, что ведет к засорению стада, стихийной гибридизации, повышению заболеваемости и т.д. Упрощенный подход к формированию и использованию маточных стад в искусственных условиях, с точки зрения генетики и селекции объектов осетроводства, а также слабое внедрение новых технологий, привели к снижению рыбоводных показателей на осетровых рыбоводных заводах. Аналогичная ситуация, связанная с формированием маточных стад, наблюдается и на воспроизводственных предприятиях (Подушка и др., 2007; Чебанов и др., 2011). Несмотря на наличие комплекса отечественных и импортных пород карпа большинство рыбхозов выращивают беспородную рыбу. Доля высокопродуктивных рыб в общем объеме производства товарной рыбы не превышает 12% (Богерук, 2002). Резкое сокращение числа производителей и

использование близкородственных пар при скрещиваниях чревато потерей природного генетического полиморфизма, инбридингом и, как следствие, значительным снижением адаптивного потенциала популяции (Мюге, Барминцева, 2011).

Одной из важнейших составляющих экономики рыбохозяйственного комплекса является аквакультура, представляющая собой вид хозяйственной деятельности по искусственному разведению и товарному выращиванию рыб и других водных организмов с целью получения различных видов продукции (Матишов и др., 2011; Матишов и др., 2013; Пономарева и др., 2014а; Пономарева и др., 2014b; Bronzi, 2011; Matishov, Ponomareva, 2014, Matishov, Ponomareva, 2015; Ponomareva et al., 2015).

С каждым годом возрастает актуальность разработки и создания новых экономически эффективных биотехнологий для сохранения биологического разнообразия гидробионтов. Особенно они необходимы для решения задач по спасению редких и исчезающих видов рыб. В соответствии с обязательствами России по выполнению Конвенции по биоразнообразию и других международных актов по сохранению природы, а также Закона РФ «Об охране окружающей среды» необходимо усилить работу по сохранению биоразнообразия ихтиофауны и водных беспозвоночных в нашей стране. Важнейшим направлением этой деятельности являются вопросы формирования и содержания генофондных коллекций как живых, так и сохраняемых в виде криоконсервированного репродуктивного материала, главным образом, спермы (Ананьев, Манохина, 2008).

Существующие технологические схемы аквакультуры недостаточно эффективны. В случае массовых заболеваний, стихийных бедствий и техногенных катастроф рыбоводные заводы и рыбопитомники, хозяйства марикультуры, не способны обеспечить производство посадочного материала в необходимых количествах. Кроме того, для восстановления их работы потребуется значительное время и средства. Работа рыбоводных заводов по воспроизводству

естественных популяций затруднена из-за недостатка полноценных производителей рыб, особенно осетровых. Прогресс в области криобиологии, биологии развития, популяционной генетики и селекции рыб, а также в других областях науки позволяет приступить к созданию новых технологий аквакультуры, отличающихся более высокой экономической эффективностью и стабильностью (Ананьев, Манохина, 2008).

Один из методов репродуктивной биологии, имеющей прямое отношение к сохранению генетических ресурсов – криоконсервация, т.е. низкотемпературное хранение живых объектов с возможностью последующего восстановления их биологических функций. В научной литературе термин «криоконсервация» чаще всего означает хранение биологических объектов в течение некоторого времени при температуре жидкого азота (-196°C), считающееся успешным, только если они полностью жизнеспособны после размораживания (Амстиславский и др., 2014).

Успешное развитие криобиологии, изучающей воздействие низких температур на живые организмы, в сочетании с искусственной репродукцией привело к появлению новых перспективных способов, позволяющих сохранить биологическое разнообразие. Эти методы хорошо комбинируются с традиционными природоохранными подходами и разведением в неволе (Амстиславский и др., 2014).

Криоконсервация является одним из наиболее привлекательных и быстроразвивающихся направлений сохранения генофонда рыб (Гахова, 1994; Ананьев, 1997; Никаноров и др., 2005; Пономарева и др., 2009; Ананьев, 2012; Цветкова и др., 2012; Шишанова и др., 2012; Ананьев, Манохина, 2013; Грунина и др., 2013; Егоров, 2013; Микодина, 2013; Савушкина, 2013; Тихомиров, 2013; Красильникова, Тихомиров, 2014a; Cabrera et al., 2010; Rud, Lutz, 2015).

Согласно данным отечественных и зарубежных ученых, за счет остановки физиологических процессов сперма может храниться при температуре жидкого азота без утраты своих репродуктивных функций десятки и даже сотни лет

(Ashwood-Smith, Friedmann, 1979; Ashwood-Smith, 1980; Whillingham, 1980; Stoss, 1983; Виленчик, 1983; Пронина, 2004; Савушкина, 2007; Пронина и др., 2010; Айбазов и др., 2011; Копейка и др., 2011; Цветкова и др., 2012; Dzuba et al., 1999; Fabbrocini et al., 2013).

Одним из путей эффективного сохранения генетических ресурсов и генетического разнообразия видов, подвидов и природных групп является создание системы низкотемпературных генетических банков, где половые клетки сохраняются в глубоководном состоянии при температуре жидкого азота - 196°C (Вепринцев, Пилиев, 1989; Гахова, 1994; Егоров, 2004а; Егоров, 2004б; Одинцова и др., 2007; Ананьев, Манохина, 2008; Богатырева и др., 2011; Айбазов и др., 2011; Цветкова и др., 2012; Белая, Тихомиров, 2013; Тихомиров, 2013; Амстиславский и др., 2014; Цветкова и др., 2014; Martinez-Paramo et al., 2009; Zhang, 2013). Развитие системы производственных криобанков и криохранилищ для сохранения геномов рыб должно тесно увязываться с созданием живых генетических коллекций, что обеспечит эффективную работу селекционно-племенных хозяйств (Ананьев, Манохина, 2007).

Использование криоконсервированной спермы для воспроизводства различных видов рыб весьма эффективно, т.к. позволяет получать крупный физиологически полноценный материал (Савушкина, 2007). Рыбы, полученные с использованием дефростированной спермы, имеют лучшие показатели выживаемости, темпа роста, плодовитости, физиолого-биохимические показатели, по сравнению с полученными традиционными методами, за счет селективного действия низкой температуры жидкого азота (Савушкина и др., 1996; Савушкина, 2005; Безусий и др., 2010; Богатырева, 2010; Шишанова и др., 2012). Как отмечает С.И. Савушкина (2005), в маточном стаде, полученном с применением криоспермы, преобладают самки, что, вероятно, обусловлено влиянием низкотемпературной консервации на хромосомный состав спермиев, в частности на Y-хромосому.

Как показали расчеты, ярко выражен экономический эффект использования генетического материала осетровых рыб, хранящегося в низкотемпературных банках по сравнению с долговременным содержанием большого количества самцов в условиях рыбоводных хозяйств, независимо от специализации аквакультурного предприятия (Богатырева, 2010; Чипинов, Богатырева, 2011).

Применение замороженно-оттаянных половых продуктов различных видов рыб с известным генотипом позволит сформировать высокопродуктивные маточные стада рыб (Корчунов и др., 2012; Пономарева и др., 2014а; Пат. 2518442), скрещивать географически удаленные друг от друга стада, а также рыб, нерестящихся в разные сроки, и сохранять естественные и доместифицированные популяции рыб (Савушина, 2013).

Сотрудниками Южного научного центра Российской академии наук (г. Ростов-на-Дону) для повышения уровня гетерогенности получаемого потомства и исключения негативных последствий инбридинга, предложена схема формирования маточного стада осетровых рыб в промышленных условиях с использованием для пополнения стада резерва криоконсервированных репродуктивных клеток самцов (сперматозоидов), сохраняющихся в низкотемпературном банке спермы. При формировании и эксплуатации маточного стада рыб рекомендовано ежегодное использование 10% долгосрочно хранившихся в жидком азоте репродуктивных клеток самцов из криобанка, что дает возможность применения высококачественной спермы в любое время, исключения риска несвоевременного созревания рыб и использования большего числа самок в репродуктивных целях (Корчунов, 2012; Пономарева и др., 2014а; Пат. 2518442).

Сотрудниками института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН совместно со специалистами Всероссийского научно-исследовательского института пресноводного хозяйства разработан метод индуцированного андрогенеза, являющегося одним из важнейших биотехнологических подходов, который может быть использован для воссоздания исчезающих видов рыб. С его

помощью можно воссоздавать генотипы редких и исчезающих видов из генетического материала спермиев как нативных, так и сохраненных с помощью криоконсервации (Грунина и др., 1990; 2013; 2014; Грунина, Рекубратский, 2005, Grunina et al., 2006). Данный метод предполагает получение потомства с чисто отцовской ядерной наследственностью и позволяет восстановить генотипы исчезающих видов исключительно из генетического материала спермиев. Опыты по получению диспермного андрогенеза с использованием криоконсервированной спермы, проведенные на севрюге и русском осетре, подтверждают возможность применения данного подхода для воссоздания генотипов из генетического материала спермиев (Грунина и др., 2014; Цветкова и др., 2014).

В настоящее время наиболее успешны работы по консервации и мобилизации генетических ресурсов в США, Канаде, Норвегии, России. Исследования по данному направлению проводятся в Украине, Англии, Франции, Израиле, Венгрии, Чехии, Индии, Бразилии, Китае, Японии, Турции. Их основное предназначение – снабжение замороженной спермой рыбоводных хозяйств. Другая функция – осуществление отбора генетического материала для селекционных работ при выведении новых пород рыб. В Европе такими объектами являются форель, карп, белый амур, белый и пестрый толстолобики. Кроме того, эти криобанки принимают участие в реализации программы по искусственному воспроизводству редких и исчезающих видов рыб, к которым в первую очередь относится атлантический и адриатический осетры, считающиеся исчезнувшими как виды. Положительный опыт использования криоконсервированной спермы для поддержания и восстановления популяционной структуры лососей имеется в Норвегии, Исландии и Канаде (Богатырева и др., 2011). К примеру, в Норвегии использование банка спермы лососевых позволило в ряде озер частично восстановить их популяцию (гибель была вызвана кислотными дождями) (Вепринцев, Пилиев, 1989).

В настоящее время в России существует ряд криобанков для сохранения биоразнообразия жизни. Во Всероссийском научно-исследовательском институте

пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) (пос. Рыбное Московской области) сформированы генетические коллекции спермы рыб, объектов аквакультуры России и стран СНГ, а также редких и исчезающих видов, популяций и пород. Коллекция представлена почти 2000 образцами спермы более 50 видов и популяций карповых, сиговых, осетровых и лососевых рыб (Цветкова и др., 2014).

В Южном научном центре Российской академии наук (ЮНЦ РАН) на научно-экспедиционной базе в пос. Кагальник Ростовской области в экспериментальном криобанке содержатся репродуктивные клетки редких и исчезающих рыб Волго-Каспийского и Азово-Черноморского бассейнов (Богатырева и др., 2011; Матишов и др., 2011-2013). Для повышения эффективности искусственного воспроизводства ценных видов рыб, увеличения гетерогенности потомства, улучшения физиологического состояния популяций в естественных водоемах и сохранения биологического разнообразия в южных морях России ЮНЦ РАН разработаны научно-методические рекомендации по сохранению биологического разнообразия южных морей РФ с применением современных методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб (Белая, Тихомиров, 2013).

В криобанке Института биофизики клетки РАН (г. Пущино Московской области) содержатся клетки разных групп растений и животных, в том числе и рыб. Также репродуктивные клетки рыб содержатся в криобанках Камчатского отдела морской биотехнологии Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН, Центральной лаборатории по воспроизводству рыбных запасов (г. Санкт-Петербург), институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков, Украина).

1.4 О некоторых криозащитных веществах, применяемых в практике низкотемпературного консервирования

Развитие криобиологии всегда было связано с поиском методов искусственной защиты клеток от повреждений при замораживании-оттаивании. Открытие криопротекторов стало той отправной точкой, с которой началось практическое применение криогенных биотехнологий. Криопротекторы применяют в составе криозащитных сред – водных растворов криопротекторов, в которых могут присутствовать различные органические и неорганические добавки. При добавлении этих сред к клеточным суспензиям физико-химические свойства вне- и внутриклеточных растворов изменяются так, что последующие изменения при замораживании-отогреве оказываются менее губительными для клеточных структур, чем изменения, происходящие при замораживании-отогреве в незащищенных объектах (Белоус, Грищенко, 1994; Тихомиров, 2014; 2015; Petrunkina, 2007; Zhmakin, 2009).

Криозащитные вещества, используемые для консервирования, недостаточно систематизированы, а предложенные классификации основаны на описании лишь отдельных свойств химических соединений. Так, по классификации Дж. Лавлока (1954), в основу которой положен один из показателей механизма криозащиты – способность проникать внутрь клетки все известные криопротекторы разделяются на экзо- и эндоцеллюлярные. Однако ее нельзя считать общей, так как клеточная проницаемость веществ для различных клеток неоднозначна, а защитный эффект может быть достигнут при применении соединений как проникающих, так и непроникающих в клетки (Белоус и др., 1987; Белоус, Грищенко, 1994; Жмакин, 2008; Тихомиров, 2014; 2015).

К экзоцеллюлярным (экстрацеллюлярным) криопротекторам относят вещества, которые «связывают» воду на поверхности клеток, защищая поверхности мембран от механических повреждений при глубокой заморозке (Белоус, Грищенко, 1994; Тихомиров, 2014). Они активируют потерю воды клетками, снижая вероятность образования внутриклеточного льда при высокой

скорости охлаждения (Жмакин, 2008). К непроникающим протекторам относятся амиды кислот (формаид, метилформаид, ацетаид, метилацетаид, диметилацетаид, пропилаид, мочеина, метилмочеина), высокомолекулярные сахара, белки (альбумин, желатин), высокомолекулярные полиэтиленоксиды и гликоли, гидроксиптилкрахмал (ГЭК), поливинилпирролидон (ПВП) и др. (Белоус, Грищенко, 1994).

Однако для большинства живых организмов использование только непроникающих криопротекторов недостаточно для успешного криосохранения (Белоус и др., 1987; Белоус, Грищенко, 1994; Борода и др., 2014).

Ко второй группе относят вещества, способные проникать внутрь клеток и связывать внутриклеточную воду внутри них (Тихомиров, 2014; 2015). Эндоцеллюлярные (интрацеллюлярные) протекторы снижают концентрацию электролитов и препятствуют уменьшению объема клеток в гипертоническом растворе (Жмакин, 2008; Eroglu et al., 2000). К числу проникающих протекторов относятся, прежде всего, представители одно- и многоатомных спиртов (метанол, этанол, этиленгликоль, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, маннит, сорбит, эритрит), оксиды (диметилсульфоксид (ДМСО), диметилсульфон, пиридиноксид), некоторые из низкомолекулярных сахаров (глюкоза) и др. (Белоус, Грищенко, 1994). Механизмы их проникновения в клетки через каналы мембран различны. Общим для всех протекторов данной группы является тот факт, что чем сложнее многокомпонентная смесь, тем более длительное время необходимо для их полного проникновения внутрь клетки (Белоус, Грищенко, 1994).

Быстрое проникновение криопротектора в клетку предотвращает ее повреждение в гипертонических криозащитных средах и по мере вымораживания воды на фоне обезвоживания клеток предупреждает возникновение на мембране повреждающих градиентов концентраций вне- и внутриклеточного раствора (Белоус и др., 1987). Несмотря на то, что проникающие протекторы, как правило, обеспечивают более эффективную защиту биологических структур при

вымораживании воды, чем непроницающие, их применение зачастую наталкивается на ряд серьезных трудностей, связанных с возвращением клеток в изотоничную среду. Следует также отметить, что высокая проницаемость криопротектора через плазматическую мембрану отнюдь не подразумевает столь же высокую его проницаемость через мембраны органелл, которые могут повреждаться в результате повышения концентрации криопротектора в клетке (Белоус и др., 1987).

Некоторые виды криопротекторов, например, полимеры окиси этилена (ПЭО) могут в своем составе содержать определенную долю мономерных фракций, которые проникают внутрь клетки, в то время как основная масса полимера остается во внеклеточной среде. Такого типа соединения могут быть причислены к криопротекторам смешанного типа (Белоус, Грищенко, 1994).

Также существуют вещества, блокирующие образование кристалликов льда. Такими свойствами обладают, например, специальные белки, вырабатываемые организмами ряда холодоустойчивых животных – арктических и антарктических рыб, некоторых насекомых и др. (Vaida, 1999; Davis et al., 2002; Graether et al., 2000; Du et al., 2003; Bouvet, Ben, 2003; Nguyen et al., 2004; Kelley et al., 2010). Природные криопротекторы (антифризные белки) являются перспективной добавкой к известным протекторам, использование которых может существенно снизить их токсическое воздействие в периоды эквilibрации и оттаивания (Цветкова и др., 2009).

М.В. Карановой (1994), А.А. Андреевым и Н.Н. Петропавловым (1994) исследованы антифризные свойства низкомолекулярных гликопротеинов крови полярных рыб и ракообразных. Показано, что в состав антифризных гликопротеинов входят значительное количество различных видов аминокислот и соединения, вырабатываемые холодоустойчивыми организмами в период перехода на осенне-зимнее состояние. Молекулы этих веществ имеют участки, обладающие комплементарностью к поверхности кристаллика льда, - «сажаясь» на эту поверхность, способствуют понижению точки переохлаждения, подавляют

рост льда и его рекристаллизацию при оттаивании (Белоус и др., 1987; Жмакин, 2008; Khlebovich, 1996; Chen, Jia, 1999; Davis et al., 2002; Cheng, 2003; Radhakrishnan, Trout, 2003; Griffith et al., 2005; Matsumoto et al., 2006; Robles et al., 2007).

Выяснение взаимосвязи между химической структурой вещества и его криопротекторной активностью – это рациональный путь исследования криопротекторов. Подтверждением целесообразности таких работ служат результаты работ Коннора и Ашвуд-Смита (1973) которые провели сравнение криопротекторной активности двух, казалось бы, близких по элементному составу – соединений: диметилсульфоксида (ДМСО) и диметилсульфона. В этих опытах в идентичных условиях замораживания и отогрева эритроцитов человека ДМСО обеспечивал сохранность до 90% клеток, в то время как диметилсульфон – только 5%. Из ряда отмеченных различий их физико-химических свойств обращает внимание следующее: температура плавления ДМСО – 18,45°C, а диметилсульфона – 109°C. Так, изменение структуры вещества повлекло изменение его физико-химических показателей и лишило эффекта криозащиты (Белоус и др., 1987).

Криопротекторы, такие как глицерин, сахароза предотвращают частичную денатурацию белков в замерзающем растворе (Жмакин, 2008; Strambini, Gabellieri, 1996), препятствуют эвтектической кристаллизации (Жмакин, 2008; Nan, Bishof, 2004). Криопротекторами служат как низкомолекулярные вещества (диметилсульфоксид $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (ДМСО), глицерин, дисахариды и др.), так и высокомолекулярные полимеры (Жмакин, 2008; Orief et al., 2005); кроме того, в качестве модификаторов криовоздействия используются металлические наночастицы (Thirumala et al., 2007). Один из параметров, определяющих эффективность криопротектора, - количество воды, которую он может связать (Бизунок, Свентицкий, 1983; Жмакин, 2008).

Присутствие криопротектора снижает текучесть мембраны (Giraud et al., 2000) и температуру главного фазового перехода (Yu, Quinn, 2000; Bryant, Koster,

2001), меняет гидравлическую проводимость мембраны (Pfaff et al., 1998) и ее температурную зависимость (энергию активации) (Devireddy et al., 1999; Devireddy et al., 2000; Gilmore et al., 2000), теплофизические свойства раствора (Choi et al., 2004) (в том числе понижает температуру кристаллизации (Mazur, Koshimoto, 2002), морфологию растущих кристаллов: так увеличение концентрации диметилсульфоксида способствует росту вторичных дендритов (Zinchenko et al., 2004); в присутствии криопротекторов понижается температура, при которой регистрируется формирование внутриклеточного льда (Жмакин, 2008; Guenther et al., 2006). Криозащитные свойства растворов, обладающих максимальной эффективностью, связаны с наличием в них антиоксидантов, предотвращающих окислительные процессы, происходящие при криоконсервации, а также с наличием сахаров, которые заметно влияют на размеры и форму кристаллов льда, образующихся при замораживании (Перов и др., 2015).

Сотрудниками Института биофизики клетки РАН совместно со специалистами Южного научного центра РАН и Астраханского государственного технического университета разработан способ снижения низкотемпературного скачка при кристаллизации растворов криопротекторов, позволяющего повысить целостность дефростированных клеток после криоконсервации. Он заключается в том, что в способе, включающем замораживание криораствора с биологическим материалом в жидком азоте, до операции замораживания раствора криопротекторов с клетками живых организмов, осуществляют дистанционное воздействие на замораживаемый раствор ультразвуковым излучением частотой 0,50 – 10 МГц (Пат. 2540598).

Однако криопротекторы помимо защитного, оказывают также и токсическое действие на клетки, что является стрессовым фактором (Белоус, Грищенко, 1994; Тихомиров, 2014; 2015). Известно, что многие, наиболее часто используемые криопротекторы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (ГЛ), являются пертурбантами плазматических

мембран и обладают способностью заменять гидратную воду, стабилизирующую конформацию белков, липидов и других биомолекул (Белоус, Грищенко, 1994). Токсичность данных веществ рассматривается с точки зрения гипотезы денатурации белков (Arakawa et al., 1990), согласно которой криопротекторы связывают воду, препятствуя тем самым нормальной гидратации белков и других макромолекул (Кучков, Зинченко, 2010).

В результате стресса, вызванного действием любого химического вещества на живую клетку, нарушается липидный бислой мембран, изменяется активность ферментных комплексов, что, в конечном счете, влияет на структурно-функциональное состояние мембран клеток и органелл, обладающих окислительно-восстановительной функцией (Барабой и др., 1992; Нардид, 2009).

Криозащитные вещества выполняют роль связывания внутриклеточной воды. Основной состав последней это биологические суспензии, которые при понижении температуры образуют монокристаллы, которые, находясь в твердой фазе, имеют особенность изменять форму и размеры при изменении отрицательных температур, что и является источником механических повреждений органелл клеток. Основная задача криозащитных сред состоит в связывании именно внутриклеточной воды в клетках.

Вместе с тем, время эквilibрации (время, необходимое для полного проникновения криопротектора внутрь клеток) должно быть, как можно меньше, так как установлено, что все криопротекторы в той или иной степени являются токсикантами для растительных и животных клеток (Пономарева и др., 2007; Богатырева и др., 2007; Тихомиров, 2014; 2015; Fahy, 1986; 2010).

В связи с этим нуждаются в пересмотре ряд установленных ранее положений, конкретизация которых может способствовать повышению выживаемости спермиев рыб после двойного температурного шока и получению надежной технологии, пригодной для использования в промышленных масштабах.

При разработке протоколов криоконсервации упущены особенности строения спермиев разных групп рыб. Поэтому целесообразно разработать универсальную методику подбора объема протективных веществ в криозащитных средах для разных видов рыб с целью снижения токсического воздействия криопротекторов на органеллы клеток. Также не исследовано влияние объема замораживаемого материала на жизнеспособность спермиев. Эти разработки позволят повысить качество и обеспечат стабильный высокий выход репродуктивных клеток после двойного температурного шока.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили с 2010 по 2015 гг. в лаборатории Водных биоресурсов и аквакультуры Отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей ФГБУН «Южный научный центр Российской академии наук» и научно-исследовательской лаборатории «Криотехнологии в аквакультуре» при кафедре «Аквакультура и водные биоресурсы» ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет».

Материал для исследований был получен на береговой научно-экспедиционной базе Южного научного центра РАН в пос. Кагальник, ФГБУ «Донской осетровый завод» (Ростовская область), ООО АРК «Белуга», Биоаквапарк – научно-технический центр аквакультуры ФГБОУ ВПО «АГТУ», Чаганском рыбопитомнике и Александровском осетровом рыбоводном заводе ФГБУ «Севкаспрыбвод» (Астраханская область) в периоды нерестовых кампаний.

Объектом исследования служили мужские репродуктивные клетки русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833), сибирского осетра ленской популяции (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), белуги (*Huso huso* Linnaeus, 1758), стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), речного окуня (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758), сазана (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), чешуйчатого и разбросанночешуйчатого карпов (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758), белого амура (*Ctenopharyngodon idella* Cuvier and Valenciennes, 1844), белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844), пестрого толстолобика (*Hypophthalmichthys nobilis* Richardson, 1845), белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Gldenstdt, 1772).

Схема проведения исследования по теме диссертации представлена на рисунке 17.

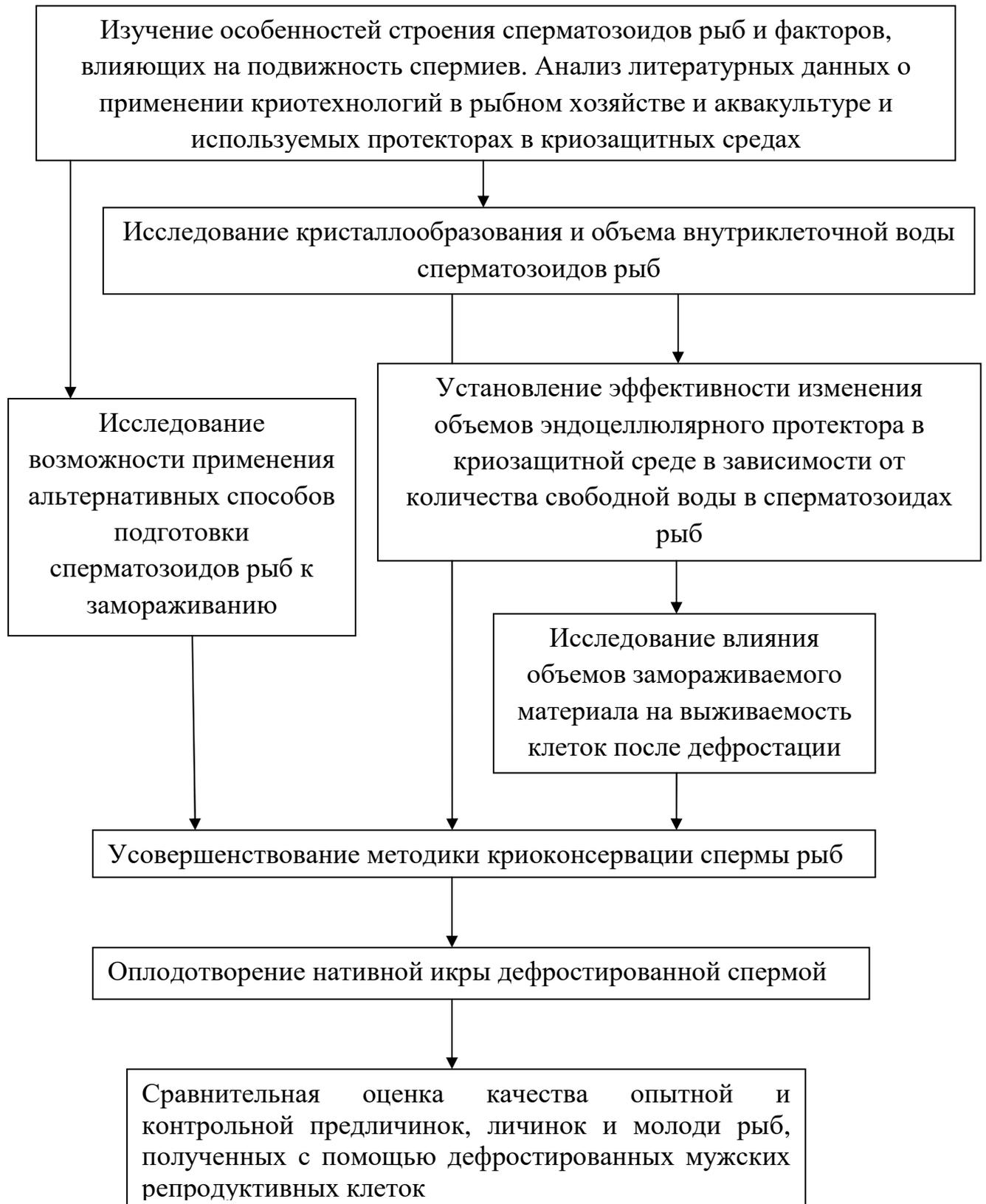


Рисунок 17 – Схема проведения исследований

Семенную жидкость собирали в пластиковые емкости (рисунок 18) и транспортировали в лабораторию в сумке-холодильнике.

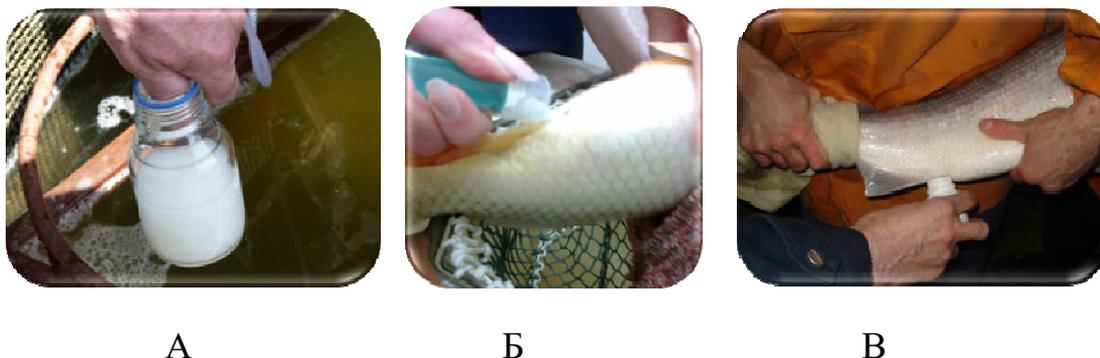


Рисунок 18 – Сбор семенной жидкости на рыбоводных предприятиях (А – осетровые рыбы; Б – карповые рыбы; В – белорыбца)

Наименование исследований и количество проведенных опытов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество проведенных опытов

Наименование исследования	Количество опытов
Исследование кристаллообразования и определение объема внутриклеточной воды в сперматозоидах некоторых рыб	400
Изменение объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от количества свободной воды в сперматозоидах	300
Исследование влияния объема замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации	600
Альтернативные способы подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию	120
Оплодотворение нативной икры дефростированной спермой в производственных условиях	1
Оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди, полученных с помощью дефростированных мужских репродуктивных клеток	60
ИТОГО	1481

Для съемки и анализа кристаллов некоторых жидкостей была смонтирована установка, состоящая из микроскопа, видеокамеры и пенопластовой кюветы, в которую была помещена камера Фукса-Розенталя с термопарой, в соответствии с рисунком 19.



Рисунок 19 – Установка для изучения кристаллообразования

Камеру Фукса-Розенталя с мазком исследуемого раствора, накрывали покровным стеклом и размещали в пенопластовой кювете, в которую подавали жидкий азот со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. Толщина слоя замораживаемой жидкости – 0,2 мм. Для регистрации фото и видео материалов использовали камеру Sony $\alpha 37$. Температуру регистрировали автоматически в реальном режиме времени с помощью термометра АТТ-2006 (Тайвань), микротермопарой (0,1-0,15 мм, медь-константан). Съемку проводили в течение всего периода замораживания и фиксировали температуру начала кристаллизации и температуру изменения состояния системы. Были исследованы следующие растворы: дистиллированная вода, раствор NaCl (13‰), подсолнечное растительное масло, полостная жидкость эякулята и протоплазма сперматозоидов.

Объем внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб определяли весовым методом. Сначала устанавливали вес пустых пробирок Эппендорфа, в которые затем помещали 1 мл семенной жидкости и снова взвешивали. Далее центрифугировали в течение 30 минут при скорости 8000 оборотов в минуту.

После этого шприцем собирали отделившуюся воду и взвешивали оставшуюся массу, в которую затем добавляли ацетон в таком количестве, чтобы он полностью покрывал массу спермиев. После вновь центрифугировали 30 минут при скорости 8000 оборотов в минуту. Отделившуюся жидкость собирали и взвешивали пробирки с содержимым. Количество сперматозоидов определяли методом подсчета в камере Горяева. Испытания проводили в трехкратной (в некоторых случаях пятикратной, в зависимости от объема семенной жидкости) повторностях. Выходным показателем являлся вес воды, выделившейся после последнего центрифугирования.

Низкотемпературное консервирование мужских репродуктивных клеток осетровых рыб и белорыбицы проводили согласно разработанной ранее методики (Богатырева, 2010; Белая, Тихомиров, 2013; Пат. 2540598). Однако в криозащитном растворе, включающем многокомпонентный физиологический раствор, сахарозу, маннит, диметилсульфоксид (ДМСО) и желток куриного яйца, на основании полученных данных о содержании внутриклеточной воды, было скорректировано содержание ДМСО (для сперматозоидов белуги его количество составило 3%, для русского осетра – 4%, для стерляди – 5%, для белорыбицы – 8%). Семенную жидкость смешивали с криозащитной средой, воздействовали низкочастотным электрическим прямоугольным раздражителем, амплитудой 150 мВ и частотой 20 Гц в течение 1 минуты (Тихомиров, Пономарева, 2008; Богатырева, 2010; Белая, Тихомиров, 2013) (рисунок 20), затем замораживали. Скорость охлаждения на линейном участке температурной кривой составляла около 150°С/мин.

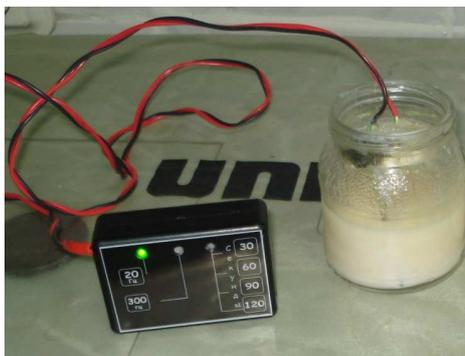


Рисунок 20 – Воздействие на оболочки клеток сперматозоидов низкочастотным электрическим прямоугольным раздражителем

Размораживали ампулы в дистиллированной воде при температуре 38°C. Отмывку от криопротектора осуществляли в физиологическом растворе с применением электростимуляции оболочек клеток сперматозоидов частотой 300 Гц (Богатырева, 2010; Белая, Тихомиров, 2013).

Выходным показателем являлось время жизни сперматозоидов после дефростации.

В экспериментальном блоке по исследованию влияния объема емкости для замораживания на выживаемость дефростированных клеток использовали разные объемы пробирок Эппендорфа – 0,5 мл, 0,75 мл, 1,5 мл и 2 мл (рисунок 21).



Рисунок 21 – Пробирки Эппендорфа разного объема

При замораживании на фторопластовой пластине (рисунок 22А), семенную жидкость с помощью автоматической пипетки раскапывали на фторопластовую пластину, расположенную в пенопластовом коробе (рисунок 22Б), при

температуре -130°C в лунки, вмещающие 45 и 130 мкл смеси спермы и криозащитного раствора, затем собранные гранулы (рисунок 22В) погружали в жидкий азот (-196°C). После хранения гранулы размораживали при комнатной температуре.



А

Б

В

Рисунок 22 – Замораживание на фторопластовой пластине: А - фторопластовая пластина; Б – раскапывание смеси семенной жидкости и криозащитного раствора на пластину; В - гранулы, объемом 130 мкл

Эксперимент планировали по типу однофакторного блочного. За блоки принята сперма от разных самцов. За факторы – объемы замораживаемого материала. Выходным показателем являлось время жизни сперматозоидов после дефростации.

При замораживании семенной жидкости в виде пленок, были взяты сетки, изготовленные из разных материалов – металл (алюминий) и пластик (полимерное стекловолокно (фибергласс) с покрытием поливинилхлорида) (рисунок 23).

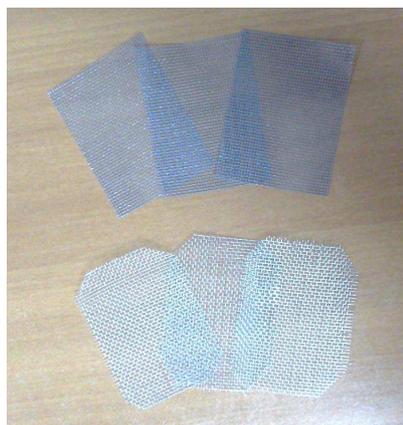


Рисунок 23 – Пластиковые сетки (полимерное стекловолокно (фибергласс) с покрытием поливинилхлорида) (сверху), металлические сетки (алюминий) (снизу)

Смесь спермы и криозащитного раствора выливали в чашку Петри, обмакивали сетки в смеси, затем замораживали со скоростью $150^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. Оттаивание происходило при комнатной температуре.

При определении возможности замораживания сперматозоидов без криопротектора посредством высушивания, каплю семенной жидкости помещали на органическое стекло и делали мазок. Затем стекла сушили в термостате при температуре 20°C , 27°C и 35°C , фиксируя время дегидратации. После высыхания сперматозоиды активировали водой и фиксировали время жизни клеток.

Определив наиболее оптимальный режим высушивания, пластины замораживали со скоростью $150^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. После хранения в течение 3 суток в жидком азоте, пластины оттаивали при комнатной температуре в течение 30 с и активировали спермии водой.

Испытания проводили в трехкратной повторности. Выходным показателем являлось время жизни сперматозоидов.

От самки русского осетра массой 20 кг, длиной 142 см, рабочей плодовитостью 229500 шт. икринок для проведения экспериментального оплодотворения было взято 50 г икры, что составило около 2250 шт. икринок. Оплодотворение проводили полусухим методом дефростированной спермой

русского осетра, замороженной в виде гранул объемом 45 мкл, хранившейся в жидком азоте 2 года. Контролем служила икра, оплодотворенная по стандартной заводской технологии (нативной спермой). Обесклеивание икры осуществляли танином из расчёта 1 г на 5 л воды. Инкубация проходила в аппарате «Осетр» (рисунок 24) в течение 6 дней.



Рисунок 24 – Инкубация икры русского осетра
(ячейка 225 – опыт, ячейка 102 – контроль)

Во избежание заражения сапролегнией, во время инкубации икру обрабатывали органическим красителем (фиолетовый К). Учет вылупившихся предличинок осуществляли сплошным поштучным методом. Выдерживание предличинок осуществляли в прямоугольных емкостях, объемом 250 л (рисунок 25).



Рисунок 25 – Емкости, в которых выдерживали и подращивали
личинку русского осетра

Воду обогащали кислородом с помощью компрессора. При переходе на активное питание личинку кормили дафнией.

Поведенческие реакции потомства оценивали в тесте «открытое поле» (А.с. 1814201; Витвицкая и др., 1990; Никоноров, Витвицкая, 1993), который проводили индивидуально, помещая одну особь (предличинку, личинку, молодь) в специальную установку, с координатной сеткой, представленную на рисунке 26.



Рисунок 26 – Тест «Открытое поле»

Сначала, при выпуске объекта в тест «открытое поле» в течение 3 минут определяли его ориентировочную активность (ОА, ед./мин.), регистрируя количество пересечений объектом координатных линий. Двигательная активность с 4-й по 7-ю минуту соответствовала фоновой активности (ФА, ед./мин.).

Первый раздражитель – свет, освещенностью 20 лк, включали на 7 минуте тестирования. Освещенность измеряли люксметром. Величина двигательной активности за первые 30 с после нанесения раздражителя определялась как P_1 , ед./мин. Через 9 минут после начала опыта наносили второй раздражитель - низкочастотный прямоугольный сигнал (частотой 20 Гц). Количество

пересечений линий координатной сетки за 30 с после его воздействия оценивали как P2, ед./мин. На 11 минуте после начала тестирования включали яркий свет (100 лк). Величина двигательной активности за первые 30 с после предъявления светового раздражителя определялась как P3, ед./мин. Через 13 минут от начала эксперимента применяли высокочастотный прямоугольный сигнал (300 Гц). P4, ед./мин. - количество пересечений линий координатной сетки за 30 с после его воздействия. Виброакустический раздражитель (P5, ед./мин.) включали на 15 минуте исследования.

Тестированию подвергались по 10 особей опытной и контрольной групп на 3-х стадиях развития: предличинка (1е сутки после вылупления), личинка, перешедшая на активное питание (8е сутки после вылупления), и молодь (15е сутки после вылупления).

Значимость различий устанавливали по t-критерию Стьюдента и F-критерию Фишера (Фишер, 1954; Ивантер, Коросов, 2011).

ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК РЫБ

3.1 Исследование кристаллообразования жидкостей и определение объема внутриклеточной воды в сперматозоидах некоторых видов рыб

3.1.1 Кристаллообразование биологических жидкостей

Живые системы содержат 80-90% воды, которая играет важнейшую роль в процессах метаболизма, стабилизации функциональной активности биополимеров и надмолекулярных структур клеток и тканей. В биологических объектах вода находится в двух состояниях: свободная, обладающая всеми характеристиками чистой воды, и связанная, с измененными свойствами (ее еще называют «незамерзающая») (Вода и водные растворы..., 1985). Вода, которая в клетках выступает в роли растворителя или среды для переноса веществ (ионов, метаболитов) регулирует интенсивность физиологических процессов, в то время как другие фракции воды участвуют в поддержании структурной устойчивости биомакромолекул и мембранных комплексов. По результатам исследований, количество свободной воды в клетке гораздо выше (до 90%), чем связанной. Содержание метаболически активной фракции свободной воды в клетках сильно варьирует (Габуда, 1982; Белоус, Грищенко, 1994; Рассадкин, 2008; Орлов, Ноздрачев, 2010).

Охлаждение сильно изменяет структуру воды, фракции которой участвуют в стабилизации конформационного и пространственного положения биополимеров. Вода, локализованная в клетке или связанная с поверхностью биомакромолекулы, сильно отличается своими параметрами от так называемой свободной воды (Белоус, Грищенко, 1994; Рассадкин, 2008).

Изучение процессов кристаллизации водных растворов – одно из важнейших направлений современной криобиологии, так как с ними связывают основные механизмы повреждения замораживаемых биообъектов (Давыдова и

др., 2012). При этом сохранность замороженных клеток зависит от формы и размера внеклеточных кристаллов, поскольку структура этого льда оказывает влияние на характер массообмена между клетками и окружающей их средой. В свою очередь, формирующаяся при замораживании морфологическая структура льда определяется механизмом ее роста (Кулешова, 2012).

Вода склонна к полиморфизму в твёрдом состоянии, где образует около 10 форм кристаллического льда (Зацепина, 1998). Таким образом, образующиеся в растворе при замораживании кристаллы являются метастабильными системами (Невзоров, 2006; Невзоров, 2009; Nevzorov, 2006).

При исследовании кристаллообразования некоторых жидкостей, постепенно охлаждая раствор до температуры жидкого азота (-196°C), наблюдали изменения формы и кристаллов. Если принять положение, что рассматриваемая система находится без изменения в определенном диапазоне температур как «стационарное состояние», то значения температур, при которых кристаллы меняют форму и размеры следует принять как «изменение состояния системы».

Согласно основам криобиологии (Смит, 1963; Пушкарь, Белоус, 1975; Белоус, Грищенко, 1994), при температуре до $(-20)^{\circ}\text{C}$ замерзает до 80% имеющейся воды в клетке. В процессе охлаждения полостной жидкости эякулята (рисунок 27) при температуре $-(5-10)^{\circ}\text{C}$ происходит начало кристаллизации, при этом наблюдают продолговатые мелкие кристаллы, характерные для свободной воды. Оставшаяся часть внутриклеточной жидкости сохраняет свою подвижность до -70°C . Дальнейшее ее охлаждение приводит к растрескиванию монолитов на микрочастицы, т.к. при более низких температурах замерзают другие фракции полостной жидкости и это объясняет разнообразие форм образовавшихся кристаллов.

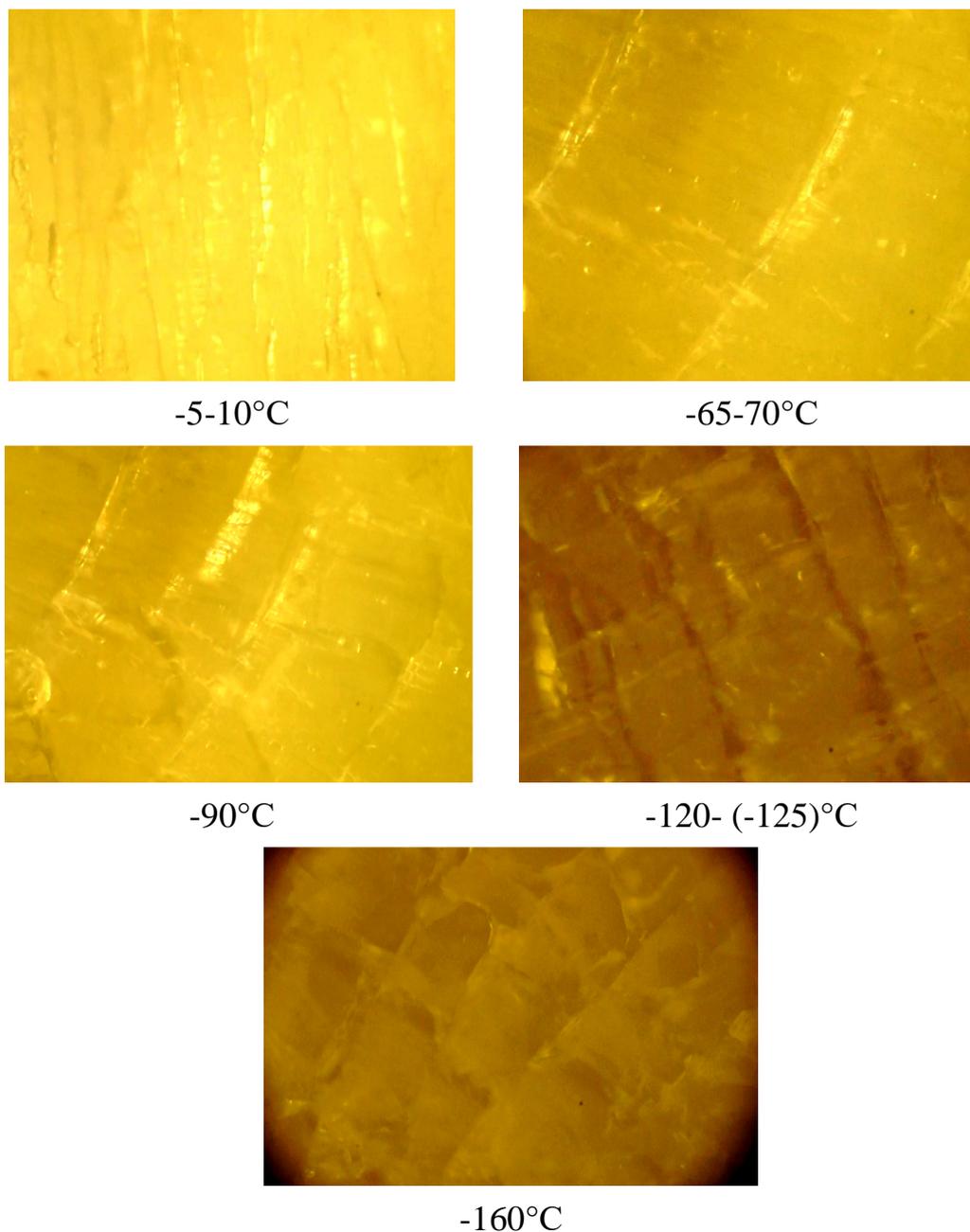
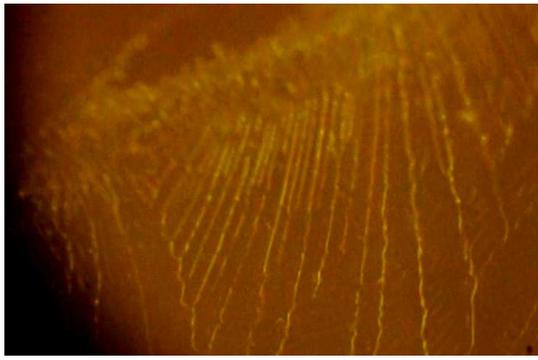
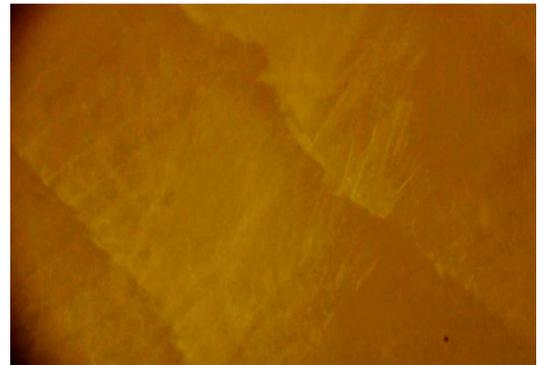


Рисунок 27 – Динамика изменения микрочастиц льда полостной жидкости эякулята

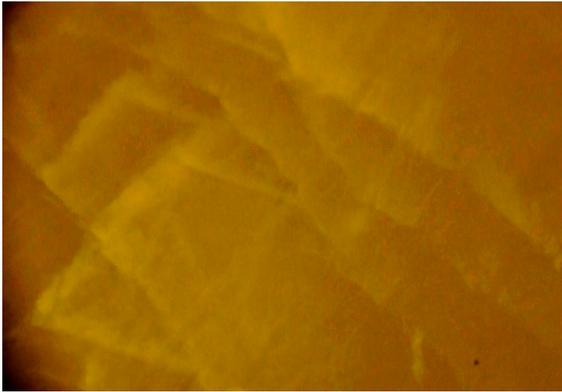
В процессе охлаждения протоплазмы сперматозоидов рыб при температуре (-10)°C кристаллы начинают дробиться и имеют прямоугольную вытянутую форму (рисунок 28), что подтверждает наличие свободной воды в протоплазме спермиев. Образование именно этих кристаллов является одним из основных факторов, повреждающих клеточные мембраны в процессе криоконсервации.



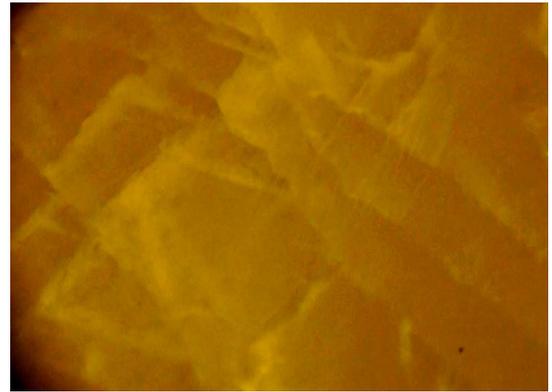
-10°C



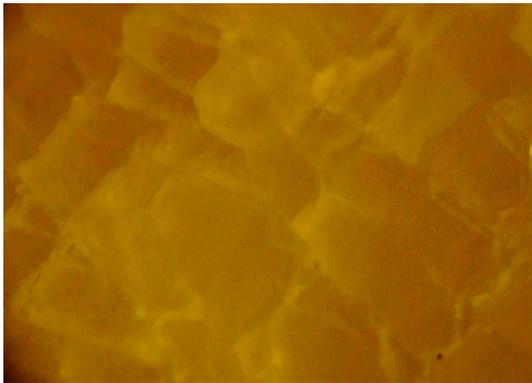
-70°C



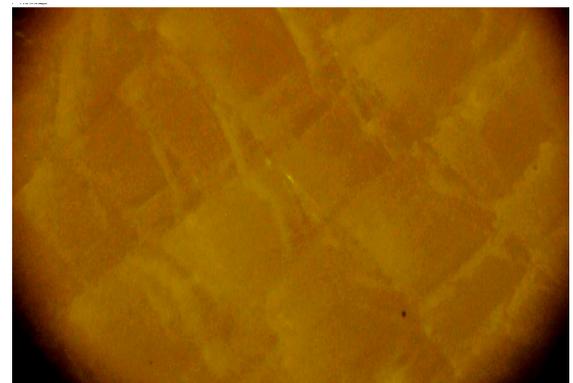
-95°C



-110°C



-145°C



-160°C

Рисунок 28 – Динамика изменения микрочастиц льда протоплазмы сперматозоидов рыб

При температуре (-70)°C начинают образовываться кубические кристаллы других суспензий протоплазмы, а точнее связанной воды, которая представляет собой фракцию, прочно связанную с белками. Данные кристаллы имеют мягкие границы, что свидетельствует об их относительной безопасности для мембран клеток при замораживании.

Состояние систем у разных растворов различно. Для сравнения, рассмотрим кристаллообразование некоторых жидкостей.

На рисунке 29 показаны изменения кристаллов дистиллированной воды в процессе замораживания до температуры жидкого азота. Температура кристаллизации находится в пределах $0 - (-5)^{\circ}\text{C}$. Растрескивание льда происходило случайным образом, размер и форма микрочастиц льда сильно различаются.

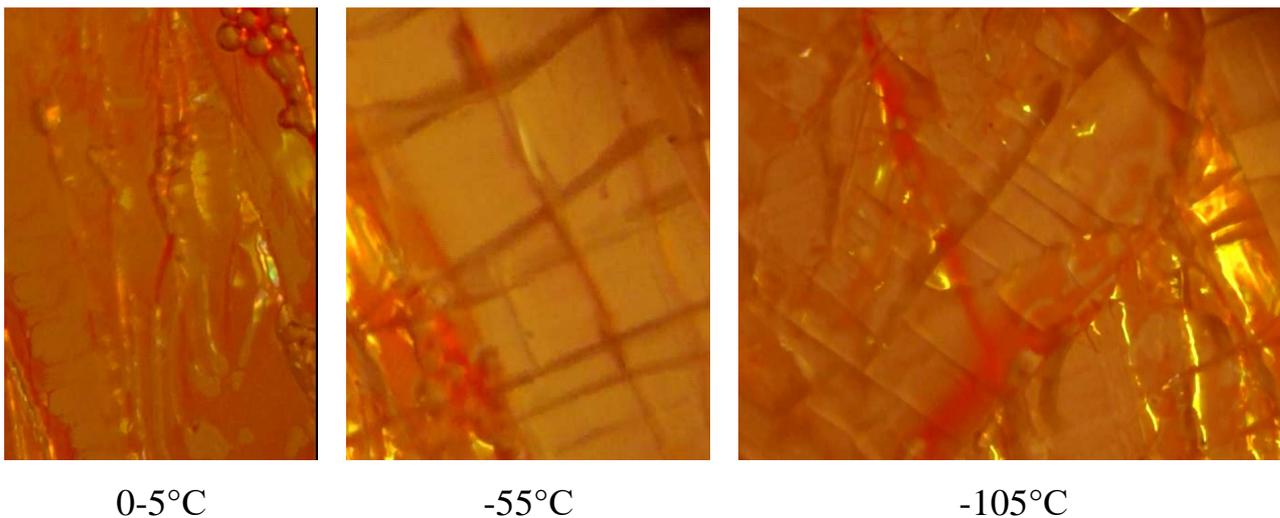
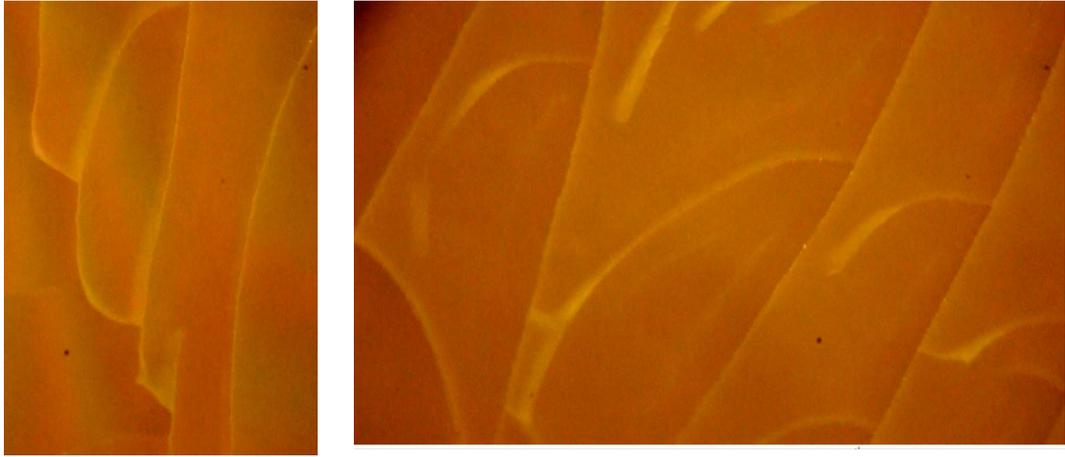


Рисунок 29 – Микрочастицы льда дистиллированной воды

Видно, что одни кристаллы укрупняются, в то время как остальные остаются без изменения. Крупные кристаллы дробятся, приобретая прямоугольную форму. Первоначальные мелкие кристаллы остаются без изменения. Таким образом, дистиллированная вода – простая система, которая в процессе замораживания изменяется три раза и находится в стационарном состоянии вплоть до температуры жидкого азота.

При замораживании растительного масла система изменялась один раз при температуре $(-80)^{\circ}\text{C}$, в соответствии с рисунком 30.



-80°C

Рисунок 30 - Микрочастицы льда растительного масла

Зарегистрированы продолговатые кристаллы с округлыми гранями. При дальнейшем понижении температуры никаких изменений не наблюдали.

При исследовании кристаллообразования раствора NaCl, соленостью 13‰ начало кристаллизации происходит при температуре $(-5)^{\circ}\text{C}$, как и у дистиллированной воды. Однако форма и размеры кристаллов иные. Они мелкие и игольчатые, образуют вытянутые в вертикальном направлении компактные нити. До -15°C система остается без изменений, в дальнейшем наблюдаем незначительное уплотнение кристаллов, в соответствии с рисунком 31.



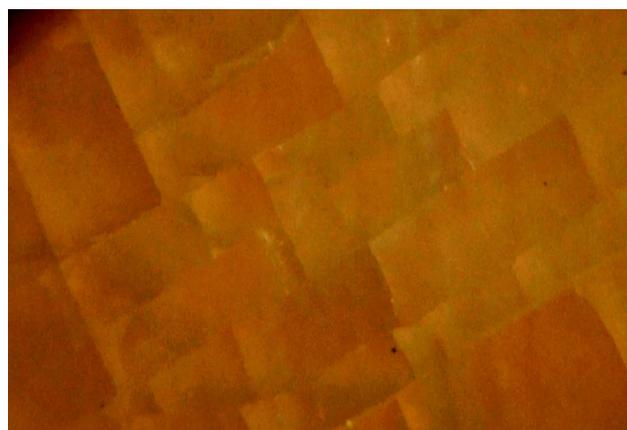
-5°C



-15°C



-85°C



-135°C

Рисунок 31 – Динамика изменения микрочастиц льда раствора NaCl соленостью 13‰

Последующее охлаждение раствора не изменяет состояние системы вплоть до температуры -85°C . Здесь кристаллы распадаются на бесформенные частицы. И в этом состоянии система находится до температуры -135°C . При завершении замораживания в растворе видно образование крупных прямоугольных кристаллов с острыми гранями.

Таким образом, различные по составу растворы образуют при глубокой заморозке разные по форме и размерам кристаллы. Явно заметны переходы от одной группы кристаллов к другой. Однако при замораживании биологических жидкостей (полостная жидкость и протоплазма) наблюдали явное отличие кристаллов свободной и связанной внутриклеточной воды.

3.1.2 Выделение свободной воды в сперматозоидах рыб

Семенная жидкость самцов рыб состоит из сперматозоидов и полостной жидкости, компоненты которой сохраняют целостность и качество репродуктивных клеток, а также отражают функции репродуктивной системы (Турдаков, 1972; Linhart et al., 2003a, 2003b; Peñaranda et al., 2003; Asturiano et al., 2004; Alavi et al., 2012a; Sejko et al., 2013; Vílchez et al., 2014).

Сперматозоиды рыб, в полостной жидкости не активны (Stoss, 1983), однако при контакте с водой начинают энергично перемещаться (Турдаков, 1972; Morisawa M., Morisawa S., 1990; Toth et al., 1997; Cosson, 2010; Sejko et al., 2013; Cosson et al., 2013; Liu et al., 2015). Осмотическое давление в семенной плазме обычно сохраняет неподвижность сперматозоидов, но, попадая в естественную среду или после разбавления семенной плазмы искусственными средами с определенной концентрацией таких ионов как Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , изменившееся осмотическое давление и pH играют решающую роль в инициации движения клеток (Gallis et al., 1991; Dzyuba et al., 2011; Gallego et al., 2011; 2014; Valdebenito et al., 2011; Pérez et al., 2013; Cosson, Prokopchuk, 2014a; Sanches et al., 2014; Prokopchuk et al., 2015). В этих условиях происходит деполяризация клеточных мембран, которая, в свою очередь, запускает работу митохондрий и стимулирует моторику хвостовой части спермиев (Morisawa, Suzuki, 1980; Morisawa et al., 1983; Alavi, Cosson, 2005a; 2005b; Alavi, Cosson, 2006). Таким образом, вода, посредством разбавления семенной плазмы и изменения осмотического давления, является основным фактором, активирующим спермии (Gallis et al., 1991; Alavi, Cosson, 2006).

После центрифугирования 1 мл спермы отмечено различное содержание отделившейся полостной жидкости (рисунок 32).

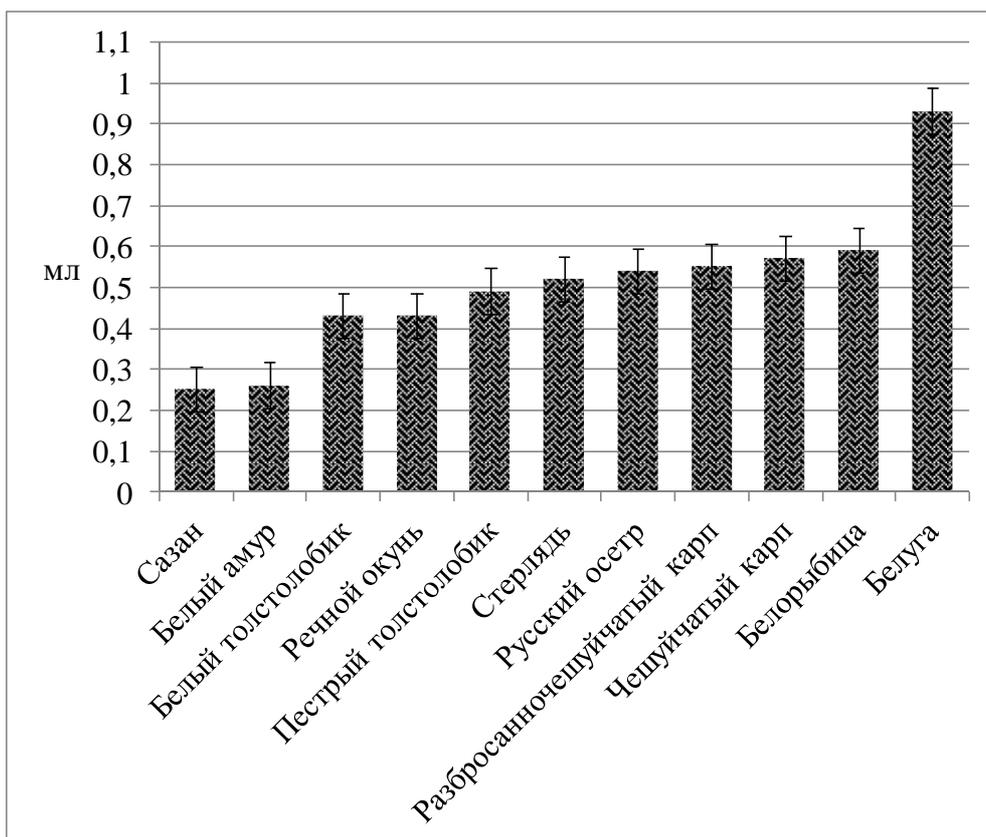


Рисунок 32 – Количество полостной жидкости в 1 мл семенной жидкости рыб

Объемы полостной жидкости у стерляди и русского осетра достоверно не отличаются от представителей семейства карповых, за исключением сазана и белого амура. Количество семенной плазмы белуги оказалось значительно больше, чем у других видов. Этот показатель носит индивидуальный характер, и зависит от таких факторов, как возраст рыбы, размерно-весовые показатели, условия содержания производителей, видовых особенностей обмена веществ на разных этапах полового цикла, порционное созревание репродуктивных клеток, различиями в строении гонад (Турдаков, 1972), механизме образования семенной плазмы (Буцкая, 1955; 1959).

Кроме того, повышение концентрации спермиев в единице объема эякулята у рыб является, видимо, одним из приспособлений к достижению успешного оплодотворения в сложных условиях внешнего осеменения (рассеивание икры,

быстрое снижение оплодотворяющей способности спермиев и оплодотворяемости икринок) (Турдаков, 1972).

Так как строение сперматозоидов рыб весьма разнообразно (Дроздов, Иванков, 1999; Mattei, 1991; Jamieson, 1991; 1999; Lahnsteiner, Patzner, 2008; Afzelius, 2013), количество свободной воды в составе протоплазмы определяет время жизни сперматозоидов и их оплодотворяющую способность. Согласно литературным данным, ее объем зависит от числа митохондрий в клетках, которое различно у разных видов рыб, в зависимости от биологии размножения того или иного вида (Baccetti et al., 1984; Mattei et al., 1981; Mattei, 1991; Jamieson, 1991; 1999).

Именно свободная вода при глубокой заморозке и является источником механических повреждений органелл средней части спермия. Зачастую наблюдают отделение головы от хвоста, посредством разрушения шейки сперматозоида (Акимочкина, 2010; Тихомиров, 2014; 2015). Следовательно, стратегия защиты сперматозоидов разных видов рыб во время криоконсервации основывается на защите именно средней части клетки, как основного места нахождения внутриклеточной воды.

Сводные экспериментальные данные по объемам свободной воды в протоплазме спермиев рыб представлены на рисунке 33.

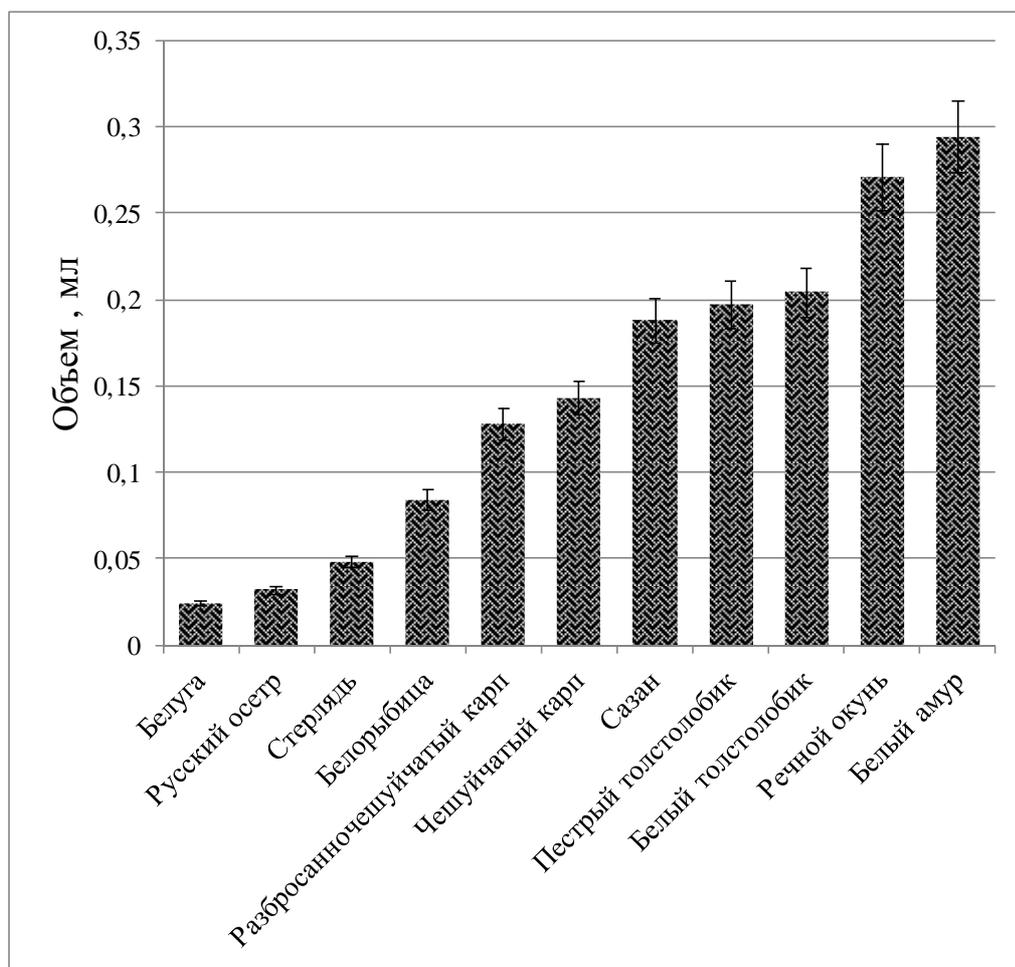


Рисунок 33 – Объем свободной воды в 1 мл спермы рыб

Наименьшие объемы отмечены у представителей семейства осетровых, причем у белуги эта величина меньше, чем у русского осетра и стерляди. Очевидно, это связано с тем, что в половых продуктах белуги много полостной жидкости, следовательно, концентрация спермиев на единицу объема меньше. Среди исследованных видов осетровых рыб наибольшее количество воды отмечено у стерляди. Вероятно, это связано с особенностями биологии, т.к. стерлядь является туводным видом, в отличие от белуги и русского осетра. Белорыбица занимает промежуточное положение между семействами осетровых и карповых рыб. У представителей семейства карповых наибольшие объемы выделены у белого амура, наименьшее – у разных пород карпа – разбросанночешуйчатого и чешуйчатого. Уровень оводненности мужских

репродуктивных клеток речного окуня (семейство окуневые) приближен к спермиям белого амура.

Спермии костистых рыб устроены более сложно (Дроздов, Иванков, 1999; Mattei, 1991; Jamieson, 1991; 1999), с большим числом органелл, что и объясняет большое содержание внутриклеточной воды, в отличие от сперматозоидов осетровых, относящихся к примитивному типу (Турдаков, 1972).

3.2 Изменение объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от объема внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб

Накопленные к настоящему времени многочисленные данные по низкотемпературному консервированию биологических объектов показывают, что процесс длительного хранения биоматериала при низкой температуре как таковой не оказывает существенного влияния на сохранность клеток и мембран после замораживания-оттаивания (Белоус и др., 1987; Богатырева, 2010; Айбазов и др., 2011; Копейка и др., 2011; Цветкова и др., 2012; Пономарева и др., 2014с; Фирсова, Тихомиров, 2014).

Основными причинами, инициирующими повреждения клеток при воздействии низких температур, являются образование вне- и внутриклеточных кристаллов льда, которые разрушают клеточные структуры и солевой (осмотический) шок, вызывающий повышение концентрации солей в клетке. Причем мелкоструктурная кристаллизация распространяется на внутриклеточное пространство и действует разрушительно (Рэ, 1962; Пушкарь, Белоус, 1975; Белоус, Грищенко, 1994; Гордиенко, Пушкарь, 1994; Хименков, Брушков, 2006; Андреев и др., 2007; Жмакин, 2008; Тихомиров и др., 2009; Кононов и др., 2011; Mazur, 1965; Pegg, 1978; Mazur et al., 1981; Mazur, 1984; Toner et al., 1993; Holt, 2000; Nan, Bischof, 2004; Zhmakin, 2009; Seki, Mazur, 2010; Spindler et al., 2012).

Добавление криопротекторов и замораживание в этих растворах снижает или исключает формирование внутриклеточного льда и обезвоживание (Лозина-Лозинский, 1972; Пушкарь, Белоус, 1975; Белоус, Грищенко, 1994; Гордиенко,

Пушкаръ, 1994; Хименков, Брушков, 2006; Тихомиров, 2014; 2015). В настоящее время известно порядка ста различных составов, обладающих криозащитным действием и апробированных на различных биологических объектах (Крупник и др., 1983), однако наиболее детально изучены биологическое действие и криопротекторные свойства только нескольких десятков веществ, широко используемых в практике низкотемпературного консервирования (Тихомиров и др., 2011). Обычно в состав криозащитного раствора входят: криопротектор (диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль и т.д.), минеральные соли и добавочные компоненты (яичный желток, сахара, белки, липиды и т.д.).

Все методики замораживания объединяет одна операция, которая является одним из наиболее важных этапов – соединение семенной жидкости с криозащитным раствором. Отечественные и зарубежные ученые предлагают разное соотношение данных величин. В большинстве случаев используют количество криозащитного раствора и семенной жидкости в соотношении 1:1 (Копейка, 1986; Цветкова и др., 1997; Цветкова и др., 2001), однако имеются публикации, в которых сперму разводили 1:3 (Legendre, Billard, 1980), 1:5 (Harvey, 1983) или даже 1:9 (Magyary et al., 1996).

Как показали исследования, проведенные ранее, для семенной жидкости осетровых рыб (Богатырева, 2010) и белорыбицы (Красильникова, 2011; Красильникова и др., 2011; Тихомиров и др., 2011) наиболее подходящей является криозащитная среда, включающая многокомпонентный базовый раствор, сахарозу, маннит, желток куриного яйца и диметилсульфоксид.

Однако, учитывая, что любые вещества, используемые в качестве протекторов, являются в том или ином случае токсикантами для любых клеток, в том числе и репродуктивных, является целесообразным использовать криопротекторы в строго дозированных соотношениях клетка-протектор, т.к. излишнее количество криопротектора, как токсиканта негативно действует на качество сперматозоидов после двойного температурного шока (Тихомиров, 2014; 2015; Fahy, 1986; 2010). Таким образом, дозированное количество

эндоцеллюлярного протектора в составе криозащитного раствора, необходимого для связывания внутриклеточной жидкости в половых клетках, должно повысить качество дефростированного материала (Красильникова, 2014; Красильникова, Тихомиров, 2014а; б; 2015).

При замораживании семенной жидкости белуги в криосреде стандартного состава, содержащей 10% диметилсульфоксида (ДМСО), время жизни спермиев составило $26,2 \pm 1,4$ мин. При криоконсервации с уменьшенным его количеством наблюдали увеличение времени жизни сперматозоидов в 1,2 раза ($31,5 \pm 1,8$ мин.). На рисунке 34 представлено время жизни спермиев белуги при замораживании в криосредах с различным содержанием эндоцеллюлярного протектора.

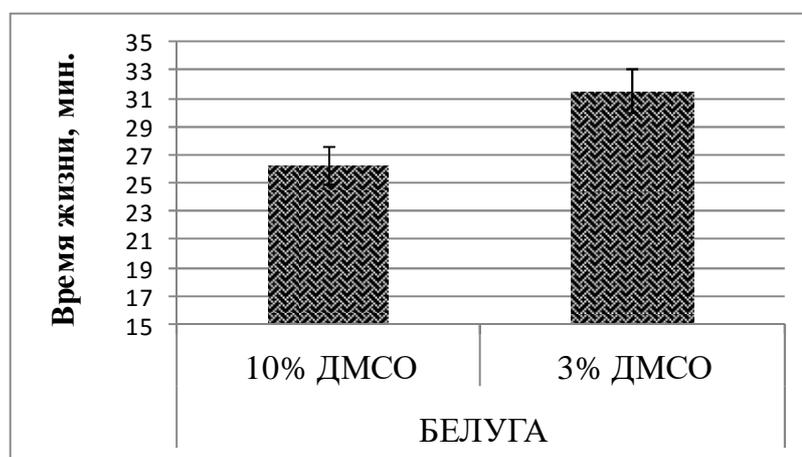


Рисунок 34 – Время жизни сперматозоидов белуги после дефростации

Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

При сравнении результатов получены достоверные различия ($t_{кр.} = 2,32$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$). Время жизни спермиев белуги при замораживании в криозащитном растворе с уменьшенным количеством протектора проникающего действия увеличилось на 20,23%.

Время жизни спермиев русского осетра, замороженных в криозащитном растворе, содержащем 10% ДМСО, составило $6,19 \pm 0,7$ мин., в криосреде с 4% ДМСО продолжительность жизни увеличилась на 47,33% и составила $9,12 \pm 1,1$

мин, в соответствии с рисунком 35. Различия достоверны с доверительной вероятностью $P=0,95$ ($t_{кр.} = 2,25$).

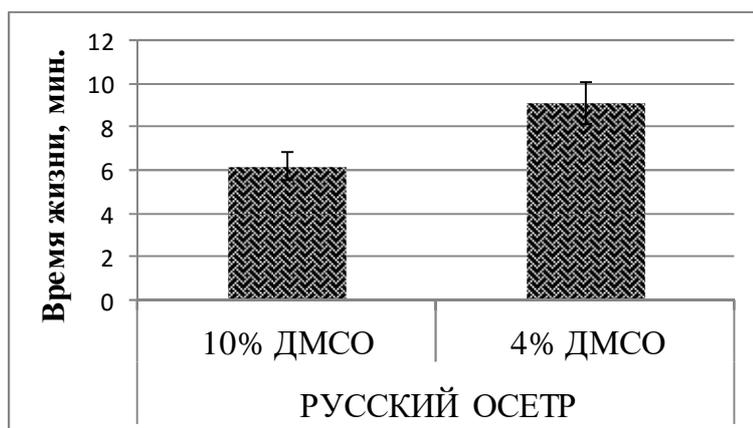


Рисунок 35 – Время жизни сперматозоидов русского осетра после дефростации

Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

При использовании в составе криозащитной среды 10% ДМСО, время жизни сперматозоидов стерляди составило $7,24\pm 0,9$ мин. При уменьшении количества проникающего протектора последнее увеличилось в 1,45 раза и составило $10,47\pm 1,2$ мин. (рисунок 36) Различия достоверны с доверительной вероятностью $P=0,95$ ($t_{кр.} = 2,15$).

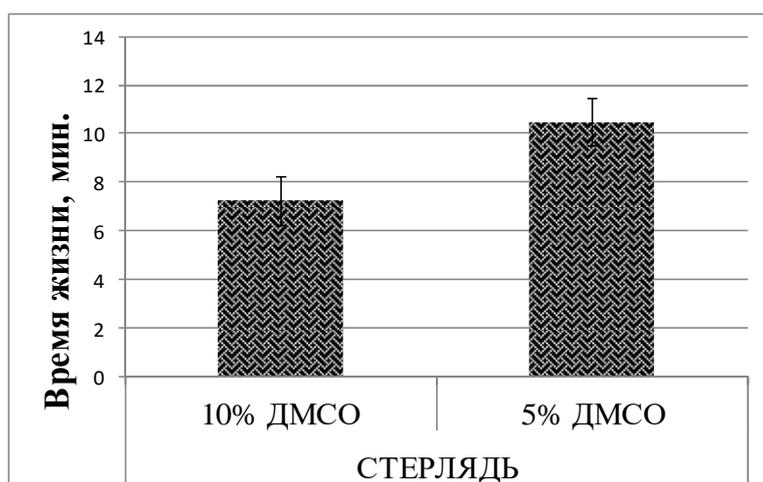


Рисунок 36 – Время жизни сперматозоидов стерляди после дефростации

Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

При замораживании мужских репродуктивных клеток белорыбицы с использованием 10% ДМСО время жизни составило 108 ± 21 с, при 4% ДМСО – 141 ± 22 с (рисунок 37).

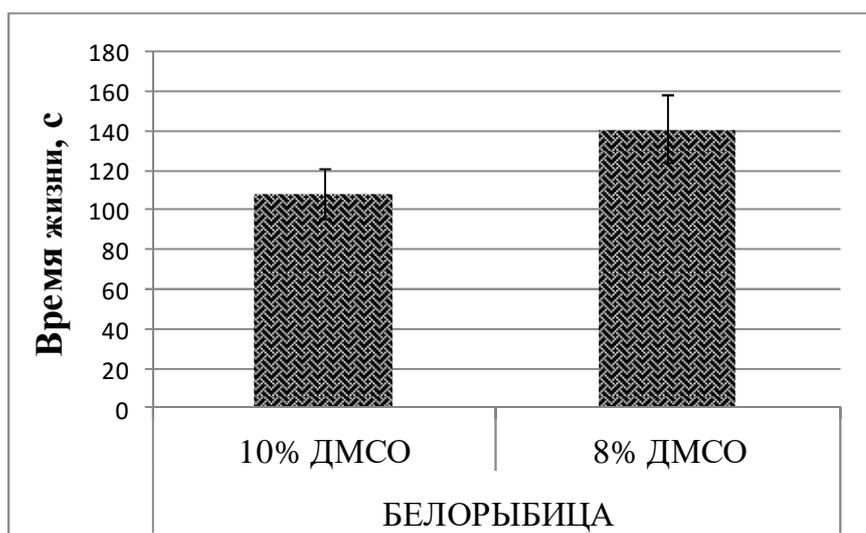


Рисунок 37– Время жизни сперматозоидов белорыбицы после дефростации

При оценке двигательной активности спермиев белорыбицы после дефростации при уменьшении содержания ДМСО в криозащитной среде время жизни увеличилось в 1,3 раза, при статистически недостоверных различиях ($t_{кр.} = 1,1$). Однако, продолжительность жизни спермиев при снижении концентрации ДМСО сохраняет тенденцию к увеличению, что подтверждает гипотезу о снижении отравляющего действия на клетки при уменьшении количества протектора проникающего действия.

Таким образом, установлена эффективность снижения объемов отравляющих веществ в составе криозащитной среды, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – 30,56%. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества

внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток самцов рыб после двойного температурного шока.

3.3 Исследование влияния объема замораживаемого материала на выживаемость репродуктивных клеток рыб после дефростации

Наряду с изучением методов защиты, необходимы исследования способов повышения устойчивости клеток к процедуре криоконсервирования, эффект которых дополнял бы защитное действие криопротекторов (Белых, Саун, 2009; Красильникова, 2012; Красильникова и др., 2013; Красильникова, Тихомиров, 2014а; в; Krasilnikova, Tikhomirov, 2014). В данном направлении наиболее привлекательными являются исследования влияния объемов замораживаемого материала на выживаемость объектов исследования.

При замораживании семенной жидкости сибирского осетра ленской популяции в пробирках разного объема наибольшее время жизни спермиев показал образец объемом 0,5 мл ($29,7 \pm 3,4$ мин.). Выживаемость в данном контейнере в 1,5 раза выше, по сравнению с пробиркой объемом 0,75 мл ($19,7 \pm 3,1$ мин.) и в 2,56 раза больше, чем в емкости 1,5 мл. Продолжительность движения клеток при замораживании в пробирке 1,5 мл составила $11,6 \pm 1,9$ мин., что в 1,7 раза меньше, чем в пробирке 0,75 мл. Время жизни клеток в образце 2,0 мл составило $11,2 \pm 2,2$ мл (рисунок 38).

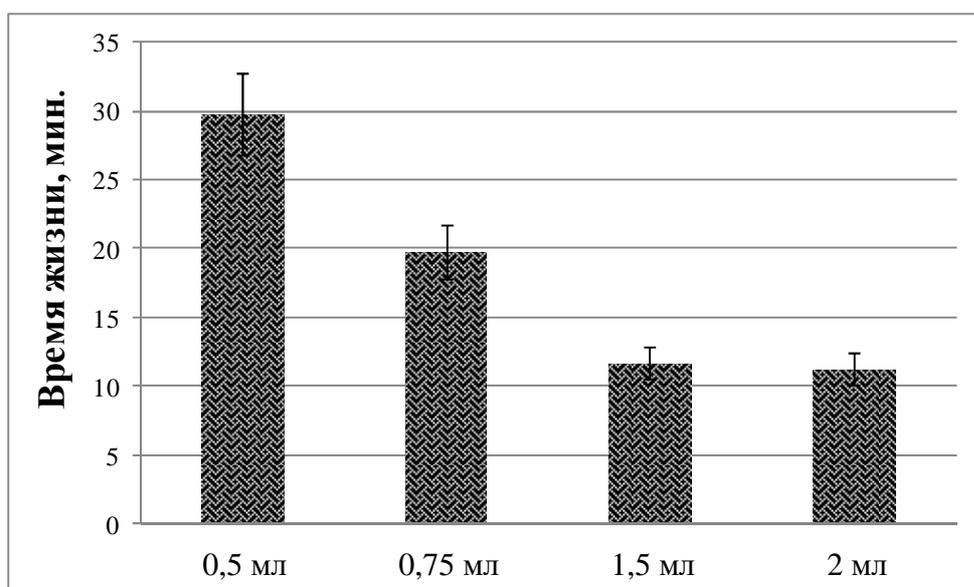


Рисунок 38 – Зависимость времени жизни сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции от объема контейнера для замораживания

При сравнении времени жизни клеток в образцах 0,5 мл и 0,75 мл получены достоверные различия с доверительной вероятностью $P=0,95$ ($t_{кр.} = 2,17$). Показатели времени жизни между образцами 0,75 мл и 1,5 мл также оказались статистически достоверными ($t_{кр.} = 2,23$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$), как и сравнение емкостей объемом 0,5 мл и 1,5 мл ($t_{кр.} = 4,65$; $\alpha=0,01$; $P=0,99$), а также 0,5 мл и 2 мл ($t_{кр.} = 4,57$; $\alpha=0,01$; $P=0,99$). Между образцами 1,5 мл и 2 мл значимых различий не выявлено ($t_{кр.} = 0,14$).

Аналогичные результаты получены при криоконсервации репродуктивных клеток русского осетра в контейнерах разных объемов (рисунок 39).

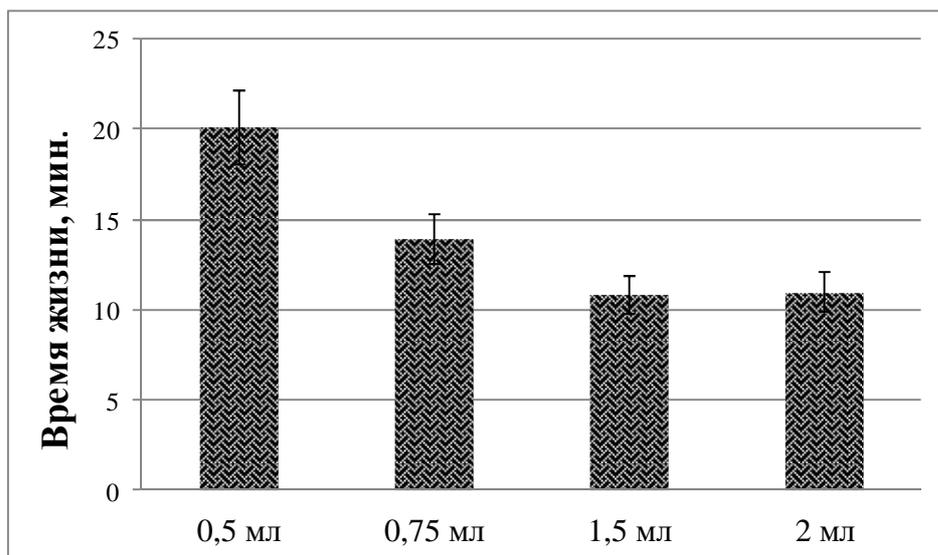


Рисунок 39 – Зависимость времени жизни сперматозоидов русского осетра от объема контейнера для замораживания

При оценке двигательной активности спермиев русского осетра, замороженной в контейнере объемом 0,5 мл время жизни составило $20,1 \pm 2,6$ мин., что в 1,45 раза выше, чем в пробирке 0,75 мл ($13,9 \pm 1,3$ мин.) и в 1,86 раза больше, чем в 1,5 мл ампуле ($10,8 \pm 1,7$ мин.). Выживаемость клеток, замороженных в объеме 2,0 мл, оказалась практически сходной с объемом 1,5 мл и составила $11 \pm 1,8$ мин. При оценке достоверности полученных результатов по t-критерию Стьюдента получены достоверные различия при сравнении объемов 0,5 мл и 0,75 мл ($t_{кр.} = 2,13$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$); 0,5 мл и 1,5 мл ($t_{кр.} = 2,99$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$); 0,5 мл и 2,0 мл ($t_{кр.} = 2,88$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$). Между объемами 0,75 мл и 1,5 мл достоверных различий не установлено ($t_{кр.} = 1,45$); 0,75 мл и 2,0 мл ($t_{кр.} = 1,31$). Однако сохраняющаяся тенденция к увеличению времени жизни спермиев при уменьшении объема замораживаемого материала подтверждает верность гипотезы.

Таким образом, при криоконсервации семенной жидкости в пробирках Эппендорфа разного объема продолжительность жизни клеток уменьшалась обратно пропорционально объему замораживаемого материала. По всей

видимости, это связано с тем, что объект небольшой вместимости имеет меньший температурный градиент, т.е. понижение температуры в образце во время замораживания происходит более равномерно, по сравнению с контейнерами больших объемов, в которых клетки, расположенные в разных точках замораживаемого образца, охлаждаются с существенно различающимися скоростями. Таким образом, неоднородность температурного поля и разброс скоростей охлаждения в образце растут с увеличением объема образца, что влияет на выживаемость клеток при криоконсервации (Красильникова, Тихомиров, 2014в).

Аналогичная картина происходит и при оттаивании ампул. Дефростация образцов меньшего объема происходит быстрее, т.е. и разброс скоростей при размораживании минимален. В больших пробирках распределение температуры при размораживании происходит неравномерно: содержимое ампулы, находящееся ближе к периферии уже имеет жидкую фракцию, в то время как «сердцевина» образца еще не растаяла.

При криоконсервации большого количества генетического материала для промышленного использования приходится учитывать простоту, технологичность и производительность методов. В связи с этим, перспективно апробировать методику криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб при высоких скоростях замораживания, что возможно достигнуть, используя фторопластовую пластину.

Результаты замораживания мужских репродуктивных клеток русского осетра на фторопластовой пластине в виде гранул объемом 45 мкл и 130 мкл представлены на рисунке 40.

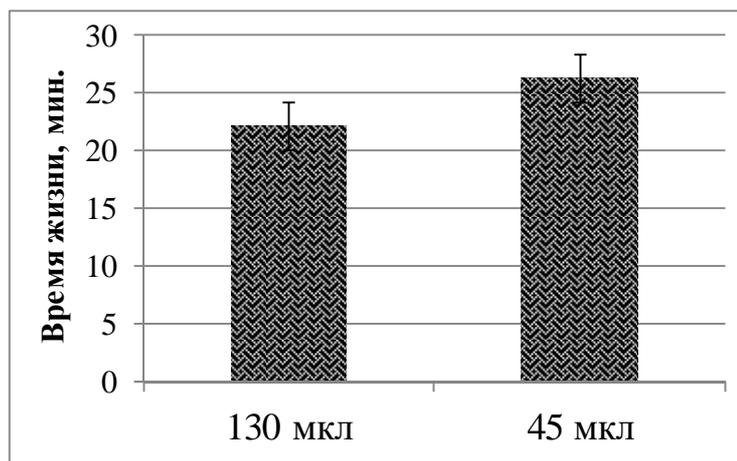


Рисунок 40 – Выживаемость сперматозоидов русского осетра при замораживании на фторопластовой пластине в виде гранул

При анализе результатов вновь прослеживается тенденция к увеличению выживаемости клеток при уменьшении объема материала. При замораживании в гранулах 45 мкл время жизни спермиев составило $26,3 \pm 2,1$ мин., что в 1,2 раза больше, чем в 130 мкл гранулах ($22,1 \pm 1,9$ мин.) и в 1,3 раза больше чем в 0,5 мл ампуле ($20,1 \pm 2,6$ мин.).

Аналогичные результаты получены при замораживании на фторопластовой пластине семенной жидкости белорыбицы, в соответствии с рисунком 41.

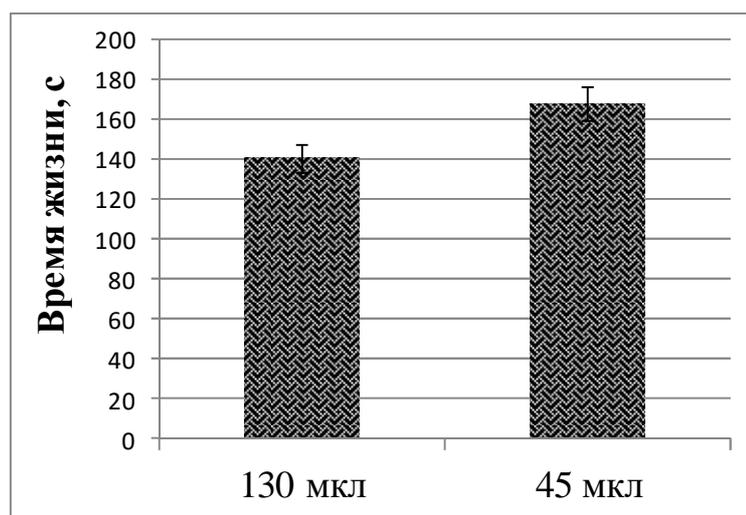


Рисунок 41 – Выживаемость сперматозоидов белорыбицы при замораживании на фторопластовой пластине в виде гранул

При замораживании семенной жидкости белорыбицы в грануле объемом 45 мкл выявлена лучшая выживаемость сперматозоидов.

Таким образом, с увеличением объема замораживаемого образца сохранность замороженных-оттаянных клеток снижается. Установлена обратная зависимость между объемом замораживаемого материала и выживаемостью дефростированной спермы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о преимущественном использовании меньшего объема при низкотемпературном консервировании спермы рыб. Это будет способствовать повышению эффективности разрабатываемых способов низкотемпературного консервирования генетического материала.

3.4 Альтернативные способы подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию

В настоящее время совершенствование методов низкотемпературного консервирования идет путем оптимизации существующих методов, применения комбинированных методов, а также поиска новых подходов к переводу клеток в состояние покоя. Такие разработки открывают новые перспективы консервации биоматериалов как для разработки фундаментальных основ, так и для практического применения в целях воспроизводства (Похиленко и др., 2009).

При криоконсервации семенной жидкости рыб обычно применяют многоступенчатые режимы охлаждения. При этом скорости их варьируют на разных этапах замораживания в определенных, строго ограниченных интервалах температур (Ананьев, Манохина, 2013). Однако, Ф.И. Шинтимировой с соавторами (2006) показано, что для осетровых рыб сверхбыстрая скорость замораживания является оптимальной. А.А. Андреевым с сотрудниками (2009) установлено, что при увеличении скорости охлаждения уменьшается площадь и периметр микрочастиц льда. При сверхбыстром охлаждении (3000-4000°/мин.) в тонком (0,1 мм) слое происходит стеклование среды.

Недавние результаты, полученные А.А. Андреевым с сотрудниками (2014), позволяют пересмотреть принятые ранее режимы замораживания половых клеток рыб. Если до последнего времени в практике криоконсервации спермы рыб преимущественно использовали ступенчатые режимы замораживания, с попытками оптимизировать данный процесс, изменяя скорости и время выдерживания биопроб при разных значениях температуры при замораживании, то в исследованиях А.А. Андреева показано, что все изменения состояния систем многокомпонентных смесей криопротекторов, равно как и биологических суспензий происходят при температурах от -140°C , когда объекты находятся в жидком азоте либо в его парах.

Альтернативный подход к замораживанию биологического материала основан на явлении «витрификации» (Кухлинг, 1985; Жмакин, 2008). Ее теоретические основы с использованием достаточно сложного математического аппарата разрабатывались еще в 1930-х годах Б.Льюэтом и его учениками и коллегами (Luyet, 1938; Luyet, Hodapp, 1938; Luyet, Gehenio, 1940). Согласно теоретическим предсказаниям, при очень высоких концентрациях криопротекторов в среде и резком снижении температуры (т.е. практически мгновенном погружении образца в жидкий азот) объект переходит в стекловидное состояние, минуя фазу кристаллизации. Некоторое время этот метод оставался на втором плане, однако сейчас он не менее популярен, чем программное замораживание (Чернов и др., 2013; Taylor et al., 2004; Chen, Tian, 2005; Cardona-Costa et al., 2006; 2009; Edashige et al., 2006; Ali, Shelton, 2007; Cardona-Costa, Garcia-Ximenez, 2007; Chen, Yang, 2007; Ding et al., 2007; Isachenko et al., 2007; Kuleshova, et al., 2007; Guan et al., 2010; Khalili et al., 2010; Quinn, 2010; Saragusty, Arav, 2011, Kasa et al., 2014).

Витрификация – процесс, при котором во время охлаждения жидкость переходит в твердую фазу (точнее, приобретает большинство свойств твердого вещества) без какого-либо существенного изменения в расположении молекул или термодинамических параметрах состояния. В частности – отсутствует

кристаллизация с сопутствующим ей выделением тепла и увеличением объема (Пульвер и др., 2014).

Методы витрификации базируются на дегидратации клеток перед замораживанием, а также на способности криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол, этиленгликоль, диметилсульфоксид и др.) в концентрациях, приводящих к полному или частичному стеклованию криозащитной среды, модифицировать процессы кристаллизации воды. Вследствие этого формируется стекловидная твердая фаза, которая позволяет получить высокий процент жизнеспособности биообъектов разной степени организации (Мусатова, Шевченко, 2014).

Температура стеклования растворов криопротекторов, использующихся в современной криобиологии, обычно имеет диапазон от -110°C до -130°C . Из-за потери подвижности молекул жидкость, превращаясь в стекло, сильно отклоняется от состояния термодинамического равновесия, в стремлении к достижению которого при температурах ниже температуры стеклования, несмотря на практически полное отсутствие диффузии, за счет остаточной молекулярной подвижности в стекле начинают идти процессы достижения равновесного состояния. Происходит релаксация сдвиговых напряжений с постепенным его уплотнением и выделением тепла (Пульвер и др., 2014). Причем перед моментом витрификации переохлажденный раствор ведет себя скорее не как жидкость, а как полимерный гель, и в зависимости от скорости охлаждения свойства (в частности, плотность и объем) образующегося стекла получают различными (Mazur, 2010; Wowk, 2010).

Все это диктует крайне жесткие требования к скоростям согревания – как правило, считается, что во избежание девитрификации скорость его должна быть как минимум в три раза быстрее критической скорости охлаждения, а порою и существенно выше (Hopkins et al., 2012).

В последние годы, исследователи стали уделять внимание разработке технологии витрификации спермиев, даже без использования криопротекторов (Садикова и др., 2006; Katkov et al., 2013). Применение метода стеклования

позволяет устранить повреждение клеток при замораживании кристаллами льда. Кроме того, это позволяет исключить из процесса замораживания использование токсичных криопротекторов, таких как ДМСО, либо значительно уменьшить их концентрации (Садикова и др., 2006).

В связи с вышеизложенным, целью настоящего раздела явилось исследование возможности замораживания репродуктивных клеток самцов рыб при сверхвысоких скоростях охлаждения на сетках т.к. при нанесении семенной жидкости на каркас сетки образуется тонкая пленка и возможен эффект витрификации (стеклования) (Красильникова, 2013).

Результаты экспериментальной серии, посвященной изучению возможности замораживания семенной жидкости осетровых рыб в виде «тонкой пленки» на сетках, изготовленных из разных материалов, представлены на рисунке 42.

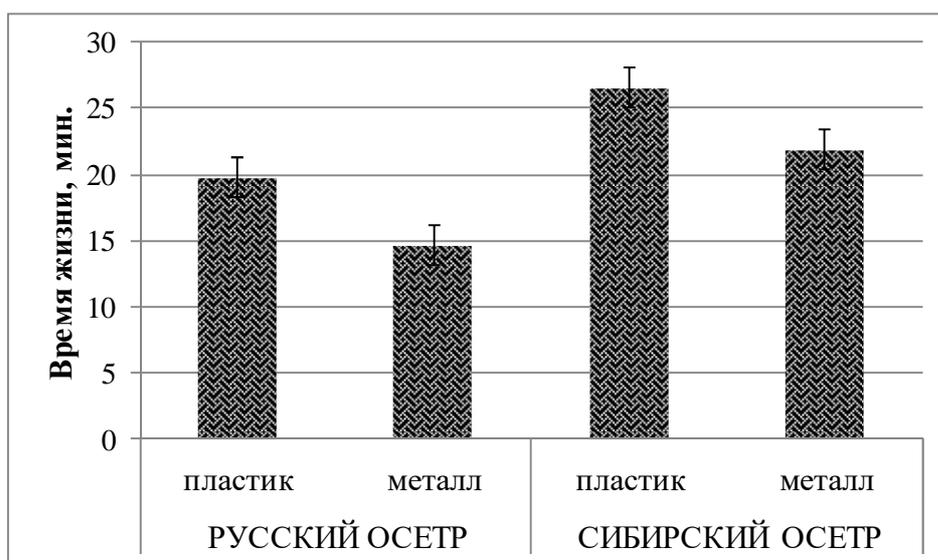


Рисунок 42 – Время жизни сперматозоидов при замораживании на сетках из разных материалов

Анализ двигательной активности сперматозоидов после дефростации показал эффективность применения данного способа подготовки семенной жидкости к низкотемпературному консервированию. Время жизни во всех опытных образцах

составило больше 14 минут, что свидетельствует о пригодности заморожено-оттаянных репродуктивных клеток для рыбоводных целей.

При замораживании спермы на пластиковых сетках продолжительность жизни репродуктивных клеток оказалась наибольшей и составила для русского осетра $19,8 \pm 2,2$ мин, для сибирского осетра ленской популяции $26,6 \pm 2,2$ мин. При использовании металлических сеток время жизни снизилось для сперматозоидов русского осетра в 1,36 раза ($14,6 \pm 1,8$ мин.), для сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции в 1,21 раза ($21,9 \pm 1,9$ мин.). Однако статистически значимых различий между использованием пластиковых и металлических сеток не было выявлено ни у русского осетра ($t_{кр.} = 1,83$), ни у сибирского осетра ленской популяции ($t_{кр.} = 1,62$).

Вторая экспериментальная серия была направлена на изучение возможности подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию путем высушивания мазка спермы в термостате, для того чтобы удалить внутриклеточную жидкость и отказаться от использования криопротектора.

Результаты опытной серии по установлению оптимальных параметров высушивания мазка спермы представлены на рисунке 43.

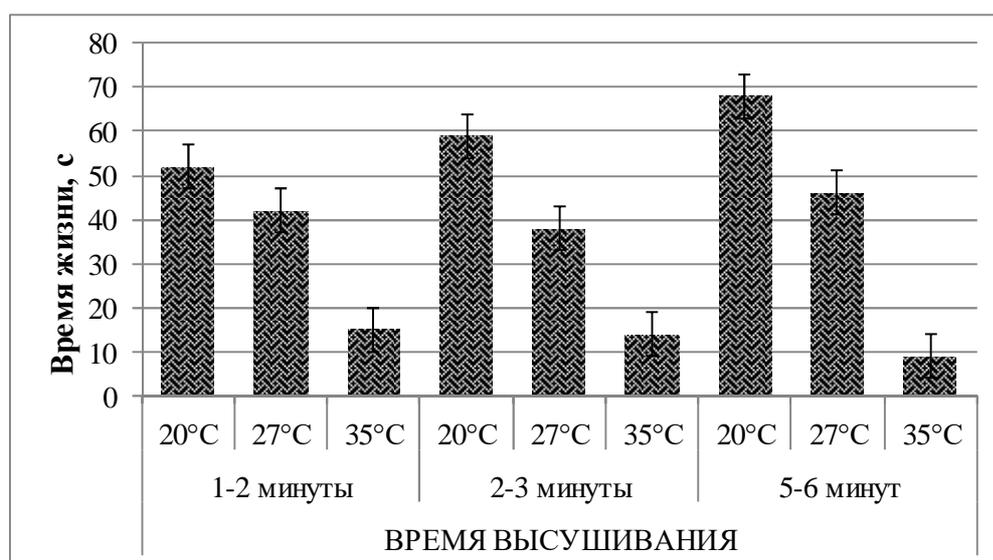


Рисунок 43 – Время жизни сперматозоидов в зависимости от температуры и времени высушивания

Необходимо было добиться такой стадии обезвоживания клеток, которая, с одной стороны, являлась бы достаточной, чтобы исключить возможность внутриклеточного льдообразования, а с другой – не достигала критического уровня, чтобы привести к неизбежному повреждению клеток. Анализ результатов выявил следующую закономерность – чем меньше температура, при которой сушились образцы, тем больше активность спермиев после их активации водой, не зависимо от времени нахождения в термостате. Наибольшее время жизни спермиев отмечено при высушивании 5-6 минут при температуре 20°C.

Определив оптимальный режим высушивания, было осуществлено замораживание пластин из органического стекла с мазком семенной жидкости, высушенных при температуре 20°C в течение 5 минут. Замораживание проводили без использования криопротектора, т.к. предполагали, что этот способ позволит избежать токсического воздействия проникающих протекторов на спермии рыб и повысит выживаемость дефростированных клеток. Скорость замораживания составила 150°C/сек.

После размораживания и активации препаратов, при среднем времени жизни – 41 ± 5 с наблюдали колебательные движения 20% спермиев, подтверждая факт о том, что при селективном действии низких температур выживают наиболее сильные спермии. По всей видимости, предварительное обезвоживание клеток вызвало структурные повреждения основной массы спермиев, связанные с дегидратацией. Так как криоконсервацию проводили после термообработки и без использования криопротекторов, большинство клеток не смогло пережить двойной температурный шок, в следствие чего дефростированные мужские репродуктивные клетки оказались не жизнеспособны. Очевидно, что данный способ подготовки клеток к криоконсервации требует доработки и совершенствования, но факт получения процент живых сперматозоидов свидетельствует о возможности применения данной методики.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ОСОБЕЙ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ РУССКОГО ОСЕТРА

Оплодотворение нативной икры репродуктивными клетками самцов, хранившимися в жидком азоте – завершающий этап, подтверждающий эффективность разработанной методики.

4.1 Оплодотворение нативной икры дефростированной спермой

От самки русского осетра массой 20 кг, длиной 142 см, рабочая плодовитость 229500 шт. икринок, для проведения экспериментального оплодотворения было взято 50 г икры, что составило около 2250 шт. икринок. Оплодотворение осуществляли дефростированной спермой русского осетра, замороженной в виде гранул объемом 45 мкл, хранившейся в жидком азоте 2 года. Контролем служила икра, оплодотворенная по стандартной заводской технологии (нативной спермой).

Время жизни криоконсервированной спермы после размораживания составило 14,2 мин., время жизни нативной 26,3 мин. Процент оплодотворения в опытной партии составил 50%, в контрольной – 80%.

Инкубация продолжалась 6 суток. Учет вылупившихся предличинок осуществляли сплошным поштучным методом. Выдерживание предличинок осуществляли в прямоугольных емкостях, объемом 250 л. Смертность за период подращивания в опытных и контрольных партиях существенно между собой не различалась и составила 7 и 5% соответственно. В таблице 2 представлены размерно-массовые характеристики подращиваемой молоди.

Таблица 2 – Морфометрические показатели предличинок, личинок и молоди русского осетра

	Масса, мг		Длина, мм	
	Контроль	Опыт (крио)	Контроль	Опыт (крио)
1-дневная предличинка	8,9 ± 0,28*	10,5 ± 0,22*	12,3 ± 0,21*	14,2 ± 0,2*
8-мидневная личинка, перешедшая на активное питание	38,2 ± 0,55*	45,0 ± 0,30*	20,7 ± 0,21	21,4 ± 0,34
15-тидневная молодь	43,8 ± 0,33*	47,5 ± 0,33*	24,0 ± 0,15*	25,2 ± 0,13*

Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,001$

Анализируя результаты измерений 1-дневных предличинок, экземпляры опытной группы превосходили контрольную партию. Установлены статистически значимые различия как между массой ($t_{кр.} = 4,44$ $\alpha=0,001$; $P=0,999$), так и между длиной исследуемых особей ($t_{кр.} = 6,55$; $\alpha=0,001$; $P=0,999$). При сравнении 8-ми дневных личинок, перешедших на активное питание установлены значимые различия между массой опыта и контроля ($t_{кр.} = 10,79$; $\alpha=0,001$; $P=0,999$), длина личинок между собой не различалась ($t_{кр.} = 1,75$). У 15-ти дневной молоди сохраняется тенденция превосходства опытной партии над контрольной: при сравнении массы $t_{кр.}$ составил 4,44 при уровне значимости $\alpha=0,001$; доверительная вероятность $P=0,999$; при сравнении длины $t_{кр.} = 6$; $\alpha=0,001$; $P=0,999$.

Превосходство размерно-массовых характеристик рыб, полученных с использованием дефростированных репродуктивных клеток самцов из криобанка по сравнению с полученными традиционными методами ранее отмечали и другие исследователи (Савушкина и др., 1996; Савушкина, 2005; Безусий и др., 2010; Богатырева, 2010).

Таким образом, рыбы, полученные с применением размороженной спермы при анализе морфометрических показателей, имели преимущество, по сравнению с молодью, полученной по традиционной технологии.

4.2 Оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб

Общим свойством живых организмов является реакция на внешние раздражители. Связь организма с внешней средой осуществляется с помощью органов чувств, которые передают их в центральную нервную систему (ЦНС). Возникновение в филогенезе животных центральной нервной системы связано с развитием адаптивных функций, т.е. способности реагировать на изменения окружающей среды изменением своего физиологического, гормонального, биохимического статуса, а также адекватными поведенческими реакциями, способствующими сохранению особи и вида (Анохин, 1975; Карамян, 1982; Крушинский, 1986; Симонов, 1987; Егоров, 2004в).

Поведение рыб, оказавшихся в незнакомой обстановке, имеет важное адаптивное значение (Непомнящих, Осипова, 2014). У осетровых, также, как и у костистых, удастся выработать положительные и отрицательные рефлексии на различного рода раздражители. Рыбы реагируют на растворенные в воде вещества, механическое воздействие, температуру, свет, звук, электрический ток, а также изменение положения тела (Егоров, 2004в).

В связи с этим было необходимо оценить качество особей, полученных с использованием криоконсервированной спермы. Комплексная количественная поведенческая оценка позволит установить уровень развития центральной нервной системы (а именно: скорость реакций на смену обстановки и реактивности ответа ЦНС на раздражители).

Любой организм, при попадании в новую обстановку, ориентируясь в пространстве, проявляет повышенную двигательную активность. Согласно

литературным данным, после вылупления у предличинки сформирован рецепторный комплекс, однако без адекватной информации из внешней среды отделы ЦНС, а именно продолговатый мозг не может нормально развиваться. Именно здесь сосредоточены основные центры-анализаторы, ответственные за взаимосвязь объекта со средой: стато-акустические органы, системы боковой линии, вкусовые рецепторы, а также нейромоторные реакции, питание и дыхание (Шмальгаузен, 1947; Лепилина, 2000; Тихонова, 2003; Абдурахманов и др., 2006).

Об уровне развития анализаторов ЦНС у рыб было предложено судить по результатам тестирования в тесте «открытое поле» (Витвицкая и др., 1990; Никоноров, Витвицкая, 1993; А.с. 1814201).

Результаты тестирования однодневных предличинки русского осетра, полученных с применением криоконсервированной и нативной спермы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Изменение поведенческих реакций однодневных предличинки русского осетра в тесте «открытое поле»

	Контроль	Опыт
Ориентировочная активность (ОА), ед./мин.	49,92 ± 3,42*	56,54 ± 2,91*
Фоновая активность (ФА), ед./мин.	53,25 ± 2,42	52,03 ± 3,13
P1 - свет, освещенностью 20 лк, ед./мин.	23,75 ± 1,42	26,13 ± 1,47
P2 - низкочастотный прямоугольный сигнал (частотой 20 Гц), ед./мин.	26,13 ± 1,68	27,5 ± 2,74
P3 – свет, освещенностью 100 лк, ед./мин.	24,0 ± 2,14	26,0 ± 1,95
P4 - высокочастотный прямоугольный сигнал (частотой 300 Гц), ед./мин.	24,13 ± 1,46	24,5 ± 2,38
P5 - виброакустический раздражитель, ед./мин.	24,88 ± 1,69	22,5 ± 1,88

*Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

Предличинки контрольной группы демонстрировали низкую ориентировочную активность, проявляя реакцию затаивания, переходящую в

медленные перемещения по опытной установке. Такое поведение отличалось от особей, полученных с использованием дефростированных мужских репродуктивных клеток ($t_{кр.} = 3,03$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$). Опытная партия вела себя более активно – это классическая реакция при изучении незнакомых условий окружающей среды, характерная для всех животных разных эволюционных групп (Егоров, 2004в). Более активная реакция ЦНС обеспечивает адаптивные возможности организма при попадании в незнакомую обстановку с адекватными и неадекватными раздражителями.

Кроме того, фоновая активность опытной группы на 8,7% ниже ориентировочной, что свидетельствует о лучшей адаптации рыб к условиям экспериментальной установки, в отличие от контрольных особей, которые, напротив, увеличили фоновую двигательную активность по сравнению с ориентировочной на 6,7%.

На рисунке 44 проиллюстрирована реакция предличинки русского осетра на различные раздражители в тесте «открытое поле».

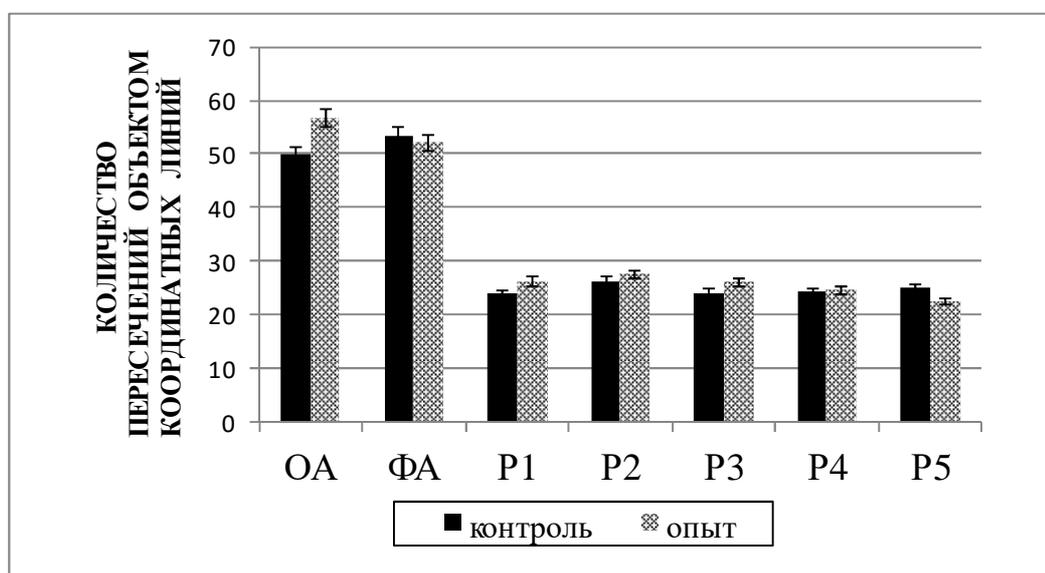


Рисунок 44 – Ответные реакции предличинки русского осетра в тесте «открытое поле»

При сравнении полученных результатов не выявлено значимых различий между ориентировочной и фоновой активностью ни в контроле ($t_{кр.}=0,79$), ни в

опыте ($t_{кр.} = 1,06$). Также между партиями в опыте и контроле реакции на разного рода раздражители статистически не различаются: при включении света, освещенностью 20 лк ($t_{кр.} = 1,17$); при воздействии низкочастотным электрическим сигналом (20 Гц) – ($t_{кр.} = 0,43$); при ярком свете, освещенностью 100 лк – ($t_{кр.} = 0,7$); при применении высокочастотного электрического сигнала (300 Гц) – ($t_{кр.} = 0,13$); при активации виброакустического раздражителя – ($t_{кр.} = 0,94$).

Динамика изменения поведенческих реакций предличинки русского осетра при тестировании в тесте «открытое поле» представлена на рисунке 45.

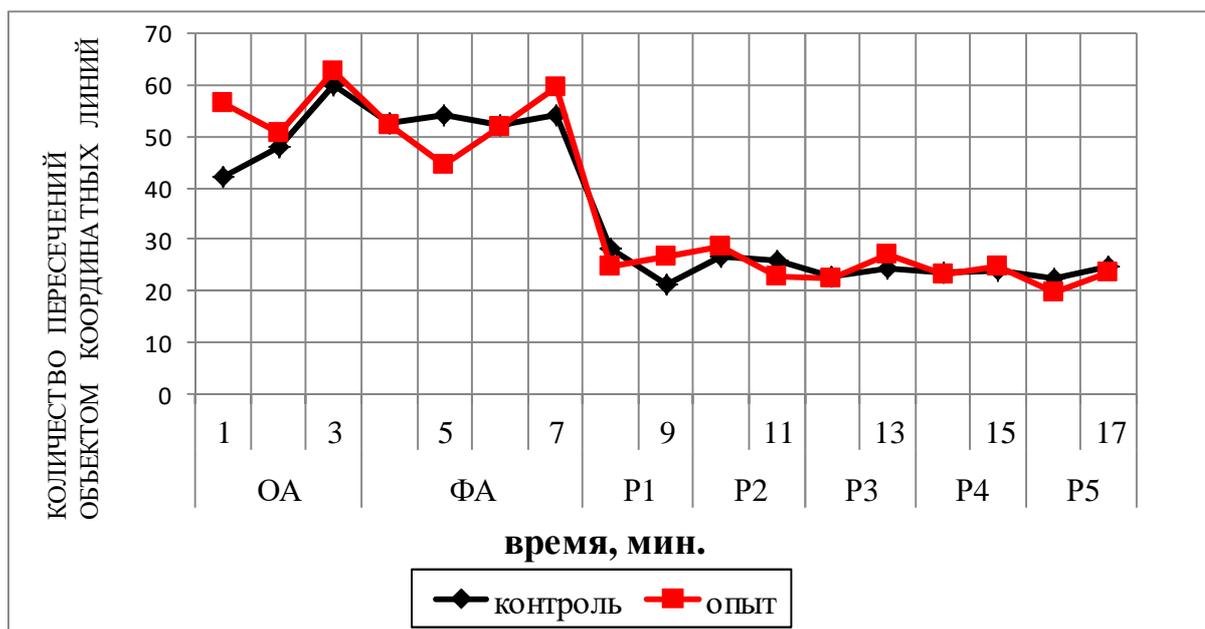


Рисунок 45 - Динамика изменения поведенческих реакций предличинки русского осетра

Поведенческие реакции партий в контроле и опыте предличинки русского осетра неоднозначны. Опытная группа, в отличие от контрольной, более реактивна. Объекты беспокоятся, реагируют на раздражители оборонительной реакцией – затаиванием, что свойственно осетровым рыбам. Однако после воздействия раздражителей реакция не возвращается на уровень фоновой активности ни у одной из групп, что свидетельствует об отсутствии у предличинки ассоциативных связей между нейронами в отделах головного мозга.

Как следует из литературных источников (Абдурахманов и др., 2006), переход личинки на активное питание сопровождается увеличением размеров зрительных долей и утолщением передней стенки четвертого желудочка. На шестой-восьмой день начинается развитие отдельных центров на дне ромбовидной ямки, а в боковых стенках и в дне четвертого желудочка обособляются отдельные центры продолговатого мозга (Абдурахманов и др., 2006).

При переходе на смешанное питание на 8-е сутки после выклева было осуществлено повторное тестирование. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Изменение поведенческих реакций личинок русского осетра в тесте «открытое поле»

	Контроль	Опыт
Ориентировочная активность (ОА), ед./мин.	42,33 ± 5,73	31,2 ± 4,35
Фоновая активность (ФА), ед./мин.	40,84 ± 5,65	39,09 ± 6,78
P1 - свет, освещенностью 20 лк, ед./мин.	37,63 ± 5,98	26,5 ± 7,38
P2 - низкочастотный прямоугольный сигнал (частотой 20 Гц), ед./мин.	32,75 ± 5,99	28,5 ± 7,42
P3 – свет, освещенностью 100 лк, ед./мин.	38,25 ± 3,76 *	21,63 ± 6,31*
P4 - высокочастотный прямоугольный сигнал (частотой 300 Гц), ед./мин.	33,63 ± 7,36	25,63 ± 6,80
P5 - виброакустический раздражитель, ед./мин.	31,88 ± 5,49	30,88 ± 6,33

*Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

Личинки, полученные с использованием спермы, хранившейся в жидком азоте по характеру реакции ЦНС достоверно не отличаются от контрольной партии, за исключением ответа на третий раздражитель - яркий свет, освещенностью 100 лк ($t_{кр.} = 2,26$; $\alpha=0,05$; $P=0,95$). Особи в опыте проявили реакцию затаивания, что свидетельствует о более быстром начале образования ассоциативных связей в зрительных буграх среднего мозга у опытной партии, в

отличие от контрольной, которая на данный раздражитель не отреагировала и ее активность сохранилась на уровне фоновой.

На рисунке 46 представлена двигательная активность личинок русского осетра.

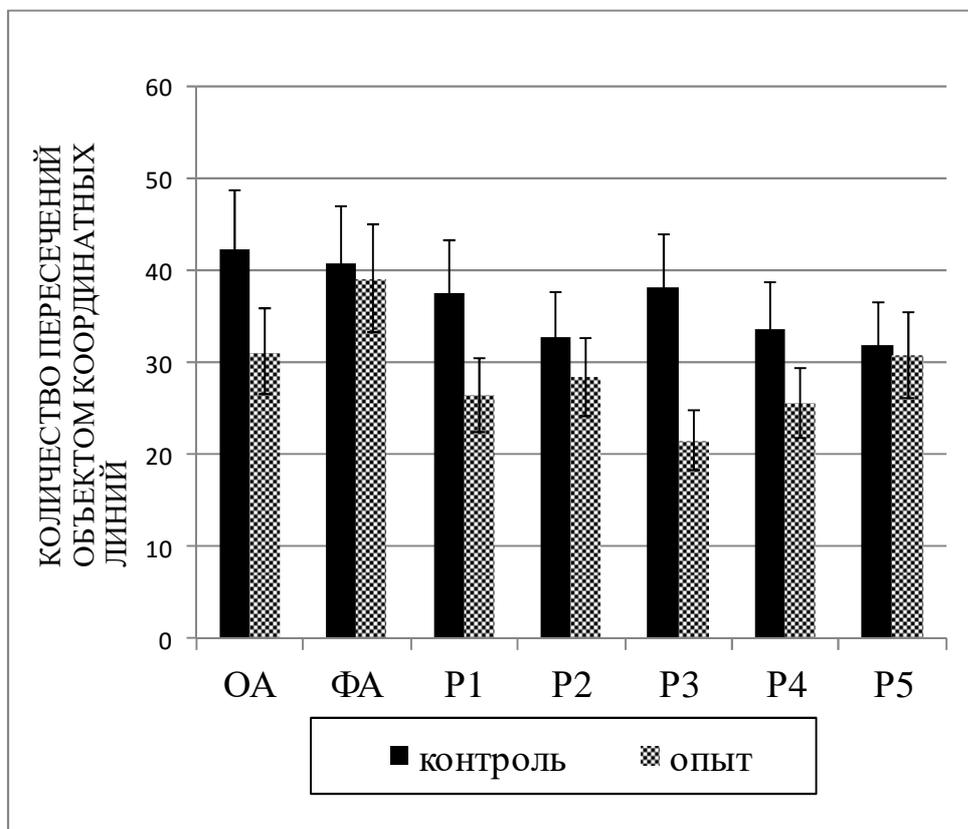


Рисунок 46 - График ответных реакций 8-дневных личинок русского осетра

Опытная группа при воздействии раздражителей наиболее выразительно проявила реакцию затаивания. Однако, при сравнении с контрольной партией полученные данные статистически недостоверны (за исключением P3) из-за больших различий ошибки средней величины, это свидетельствует о том, что через 8 суток развития особи приобретают индивидуальные особенности и необходима их сортировка.

Динамика изменения поведенческих реакций личинок русского осетра при тестировании поведенческих реакций в тесте «открытое поле» представлена на рисунке 47.

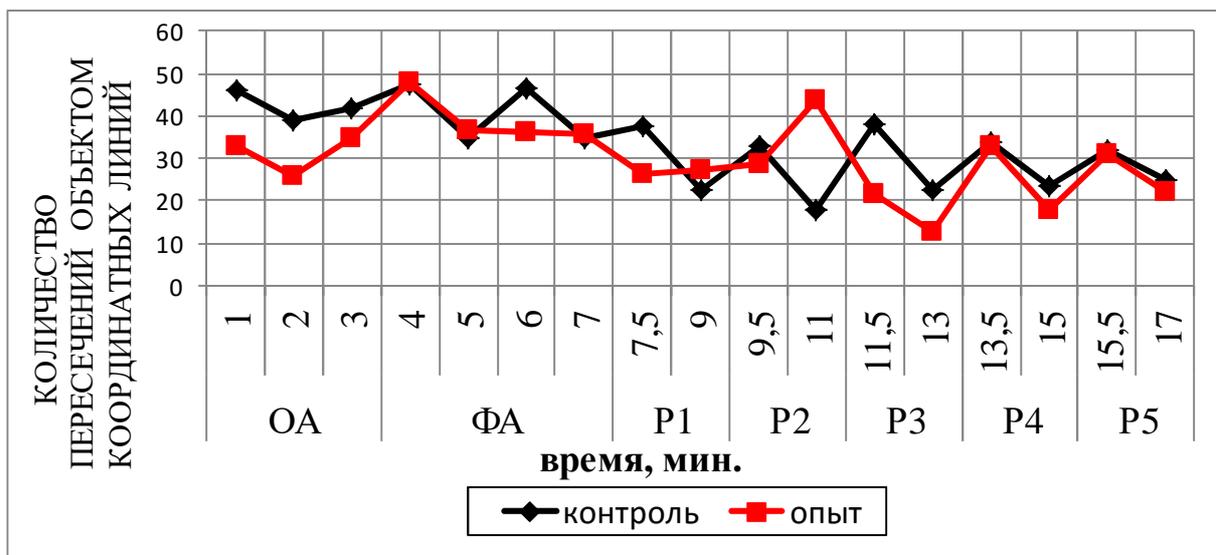


Рисунок 47- Динамика изменения поведенческих реакций личинок русского осетра

Как видно из рисунка 47, группы в контроле и опыте слишком возбудимы. Однако к концу периода фоновой активности они успокаиваются, причем у опытной партии это происходит раньше. У рыб нет адаптации к новым условиям, состояние центральной нервной системы нестабильно, особи не могут оценить качество раздражителя, это может быть связано с особенностями бассейнового содержания.

На 15-е сутки развития молоди вновь была осуществлена оценка поведенческих реакций в тесте «открытое поле», в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5 – Изменение поведенческих реакций молоди русского осетра в тесте «открытое поле»

	Контроль	Опыт
Ориентировочная активность (ОА), ед./мин.	65,46 ± 3,47	71,83 ± 4,00
Фоновая активность (ФА), ед./мин.	76,78 ± 1,85*	67,84 ± 1,29*
P1 - свет, освещенностью 20 лк, ед./мин.	47,0 ± 3,82	39,13 ± 4,97
P2 - низкочастотный прямоугольный сигнал (частотой 20 Гц), ед./мин.	48,0 ± 2,74	41,0 ± 2,53

Р3 – свет, освещенностью 100 лк, ед./мин.	38,75 ± 2,66	41,63 ± 4,93
Р4 - высокочастотный прямоугольный сигнал (частотой 300 Гц), ед./мин.	41,25 ± 3,41	39,38 ± 5,62
Р5 - виброакустический раздражитель, ед./мин.	34,5 ± 3,5	31,5 ± 4,45

*Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,001$

При сравнении фоновой активности контрольной и опытной групп выявлены статистически значимые различия ($t_{кр.} = 3,96$; $\alpha=0,001$; $P=0,999$). Однако фоновая активность опытной партии молоди на 6% ниже, чем ориентировочная, что свидетельствует о лучшей адаптации рыб к условиям экспериментальной установки. Контрольные особи, напротив, увеличили фоновую двигательную активность по сравнению с ориентировочной на 17%, следовательно рыба не может адекватно оценить обстановку, что свидетельствует о недостаточном развитии отделов продолговатого мозга (рисунок 48). Последнее связано с «информационно обедненной» средой при содержании в аквариальных условиях (Никоноров, Витвицкая, 1993).

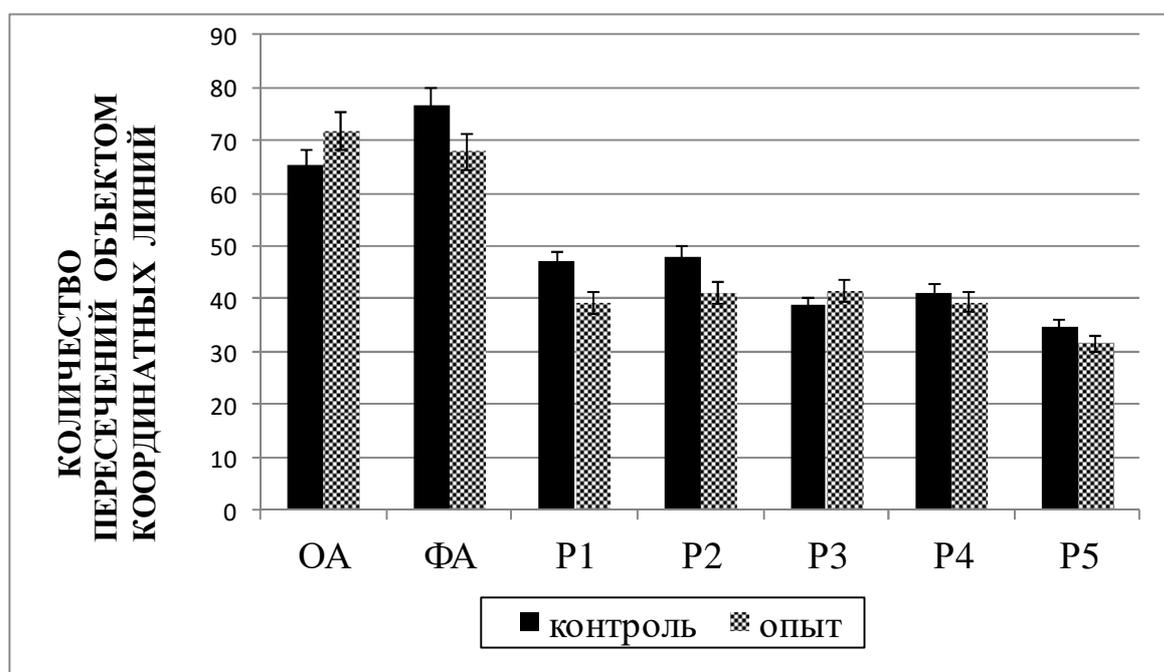


Рисунок 48 - График ответных реакций 15-дневной молоди русского осетра

Особи обеих партий адекватно отреагировали на предложенные раздражители классической реакцией затаивания. Установлены значимые различия между фоновой активностью и ответной реакцией на раздражители как в контрольной, так и в опытной партии. Это свидетельствует о начале формирования межнейронных связей в продолговатом мозге. Значимых различий между группами не выявлено.

Динамика изменения поведенческих реакций молоди русского осетра при тестировании в тесте «открытое поле» представлена на рисунке 49.

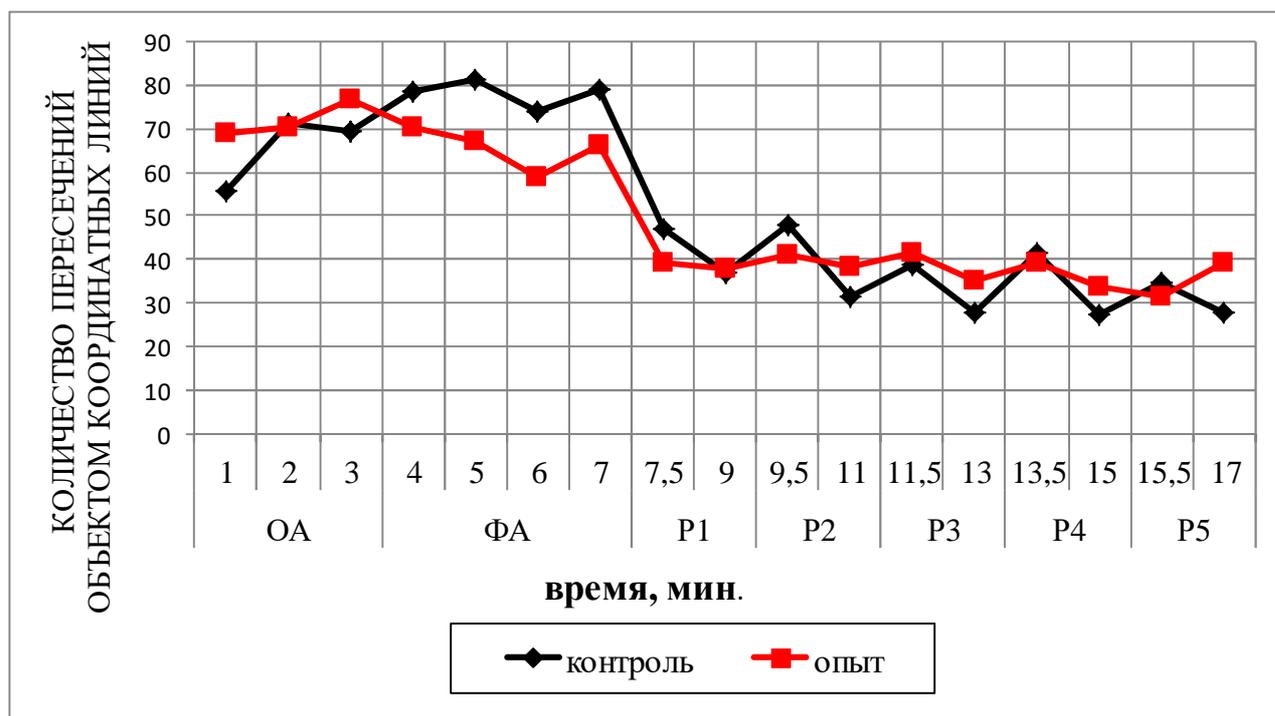


Рисунок 49 - Динамика изменения поведенческих реакций молоди русского осетра

У исследуемых групп рыб ориентировочная активность не перешла в фоновую. Контрольная партия более ярко отвечала на предложенные раздражители, что говорит о нестабильном состоянии центральной нервной системы. Опытная группа более стабильна, она различает раздражители и реагирует на них затаиванием.

Таким образом, полученное крио-потомство оказалось жизнеспособным и по реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса иногда превосходило контрольную партию. Небольшая разница в развитии предличинки, личинок и молоди рыб в обеих партиях может быть следствием разницы в криоустойчивости субпопуляций замораживаемых клеток (Beirão et al., 2011). Однако, при оценке совокупности реакций особей, полученных по традиционной технологии и с использованием дефростированной спермы, не выявлено различий между опытной и контрольной партиями.

Таким образом, проведенные исследования по корректировке стандартной методики криоконсервации сперматозоидов осетровых рыб и белорыбицы показали преимущества предлагаемых приемов и могут быть рекомендованы для использования в производственных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время проявляется повышенный интерес к методам криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб для применения в рыбном хозяйстве и аквакультуре. В связи с тем, что сперматозоиды рыб имеют разнообразное строение, размеры и формы, было необходимо усовершенствовать методику низкотемпературного консервирования с учетом этого фактора.

В процессе исследований выявлено различие в кристаллообразовании свободной и связанной внутриклеточной воды. Установлено различное содержание свободной воды у представителей разных семейств рыб, так как именно она при глубокой заморозке является источником механических повреждений клеток. Наименьшее ее содержание отмечено у представителей семейства осетровых, наибольшее – у карповых. Белорыбица занимает промежуточное положение.

На основании полученных данных, скорректировано количество протектора проникающего действия в криозащитных средах для осетровых рыб и белорыбицы, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – 30,56%. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток рыб после двойного температурного шока.

Исследовано влияние объемов замораживаемого материала на выживаемость сперматозоидов после дефростации, как одного из способов повышения устойчивости клеток к процедуре криоконсервирования, эффект которых дополнял бы защитное действие криопротекторов. При криоконсервации семенной жидкости в пробирках Эппендорфа разного объема продолжительность жизни дефростированных спермиев уменьшалась обратно пропорционально

объему замораживаемого материала. При криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб при высоких скоростях замораживания на фторопластовой пластине в гранулах 45 мкл время жизни спермиев русского осетра увеличилось в 1,2 раза, чем в 130 мкл гранулах и в 1,3 раза по сравнению с 0,5 мл ампулой Эппендорфа. Полученные результаты позволяют сделать вывод о преимущественном использовании меньшего объема при низкотемпературном консервировании спермы рыб. Последнее будет способствовать повышению эффективности разрабатываемых способов низкотемпературного консервирования генетического материала.

Показана эффективность замораживания семенной жидкости на сетках в виде тонкой пленки. Время жизни сперматозоидов осетровых видов рыб во всех опытных образцах составило больше 14 минут. При подготовке к замораживанию репродуктивных клеток самцов белорыбицы путем высушивания мазка спермы в термостате, среднее время жизни клеток после дефростации составило 41 ± 5 с, подтверждая факт о том, что при селективном действии низких температур выживают наиболее сильные спермии.

При оплодотворении в производственных условиях дефростированной спермой русского осетра, замороженной в виде гранул объемом 45 мкл, хранившейся 2 года в жидком азоте, процент оплодотворения в опытной партии составил 50%, в контрольной – 80%. Полученное крио-потомство оказалось жизнеспособным. Более того, рыбы, полученные с применением криоспермы при анализе морфометрических показателей имели небольшое преимущество, по сравнению с особями, полученными по традиционной технологии. По совокупности реакций предличинок, личинок и молоди, полученных по традиционной технологии и с использованием дефростированной спермы, не выявлено различий между опытной и контрольной партиями.

Таким образом, проведенные исследования по совершенствованию процесса криоконсервации сперматозоидов осетровых рыб и белорыбицы показали

преимущества предлагаемых приемов и могут быть рекомендованы для использования в производственных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Различные по составу растворы образуют при глубокой заморозке разные по форме и размерам кристаллы. При замораживании биологических жидкостей (полостная жидкость и протоплазма) наблюдали отличие кристаллов свободной и связанной внутриклеточной воды.

2. Установлено различное содержание свободной внутриклеточной воды у представителей разных семейств рыб. Наименьшее ее содержание у представителей семейства осетровых, наибольшее – у карповых. Белорыбица занимает промежуточное положение.

3. Показана эффективность снижения объемов протектора проникающего действия в составе криозащитной среды, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – 30,56%.

4. Установлена прямая зависимость между объемом замораживаемого материала и выживаемостью дефростированной спермы. С увеличением объема замораживаемого образца сохранность замороженных-оттаянных клеток снижается.

5. Показана эффективность замораживания семенной жидкости на сетках в виде тонкой пленки. Время жизни сперматозоидов осетровых во всех опытных образцах составило больше 14 минут. При замораживании обезвоженных в термостате образцов спермиев их выживаемость составила 20%, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований в данном направлении.

6. При получении жизнеспособных особей с использованием дефростированной спермы, хранившейся 2 года в жидком азоте, процент оплодотворения в опытной партии составил 50%, в контрольной – 80%. Рыбы, полученные с применением криоспермы при анализе морфометрических

показателей имели преимущество, по сравнению с особями, полученными по традиционной технологии.

7. При оценке совокупности реакций предличинок, личинок и молоди, полученных по традиционной технологии и с использованием криоконсервированной спермы, различий не выявлено.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При приготовлении криозащитных сред рекомендуется добавлять криопротектор проникающего действия: для семенной жидкости белуги – 3%, для русского осетра – 4%, для стерляди – 5%, для белорыбицы – 8%.
2. При проведении процедуры замораживания рекомендуется использовать наименьший объем замораживаемого материала.
3. При заготовке репродуктивных клеток в промышленных объемах для длительного хранения в криобанке рекомендуется использовать фторопластовую пластину.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДМСО – диметилсульфоксид

ГЛ – глицерин

ПЭО – полимеры окиси этилена

ГЭК – гидроксипропилкрахмал

ПВП – поливинилпирролидон

1,2-ПД – 1,2-пропандиол

ЦНС – центральная нервная система

ОА – ориентировочная активность, ед./мин.

ФА – фоновая активность, ед./мин.

P1 – первый раздражитель – свет, освещенностью 20 лк, ед./мин.

P2 – второй раздражитель – низкочастотный прямоугольный сигнал (частотой 20 Гц), ед./мин.

P3 – третий раздражитель – свет, освещенностью 100 лк, ед./мин.

P4 – четвертый раздражитель – высокочастотный прямоугольный сигнал (частотой 300 Гц), ед./мин.

P5 – пятый раздражитель – виброакустический раздражитель, ед./мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманов, Г.М. Развитие жизненно важных органов осетровых в раннем онтогенезе / Г.М. Абдурахманов, В.Ф. Зайцев, О.В. Ложниченко, Н.Н. Федорова, Э.Ю. Тихонова, И.Н. Лепилина. – М.: Наука, 2006. – 220 с.
2. Абрудахманов, Г.М. Замечательные особенности биологического разнообразия Каспийского моря, пути его сохранения и рационального использования / Г.М. Абрудахманов, М.-Р.Д. Магомедов, А.А. Гаджиев, Э.М. Меджидова // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция. Астрахань, 18-19 сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – С. 13-28.
3. Айбазов, А.-М.М. К вопросу о сохранении генофонда и биологической полноценности криоконсервированной спермы / А.-М.М. Айбазов, П.В. Аксенова, К.К. Ашурбегов, Д.В. Коваленко // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 24-29.
4. Акимочкина, Т.И. Цитологические особенности спермиев ценных видов рыб Волго-Каспийского бассейна и их изменение в зависимости от условий криоконсервации: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Акимочкина Татьяна Ивановна. – Астрахань, 2010. – 24 с.
5. Амстиславский, С.Я. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия / С.Я. Амстиславский, Т.О. Абрамова, Е.Ю. Брусенцев, Е.А. Кизилова // Природа. – 2014. – № 9. – С. 24-33.
6. Ананьев, В.И. Концепция сохранения и устойчивого использования биоразнообразия с применением методов криоконсервации геномов гидробионтов / В.И. Ананьев // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информпакет. ВНИЭРХ, 1997. – Вып. 1. – С. 1-36.
7. Ананьев, В.И. К вопросу о создании национальной системы генофондных коллекций рыб и других гидробионтов России для аквакультуры и

сохранения редких и исчезающих видов: правовые и нормативно-методологические аспекты / В.И. Ананьев, М.С. Манохина // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С. 19-24.

8. Ананьев, В.И. К вопросу подготовки новой редакции научно-технической программы «Криобанк гидробионтов» на 2009-2014 гг. / В.И. Ананьев, М.С. Манохина // Материалы конференции «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия (Пушино, 28–30 октября 2008 г.). Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 15-16.

9. Ананьев, В.И. Координационная деятельность и управление комплексными научными разработками в области аквакультуры и сохранения биоразнообразия рыб / В.И. Ананьев // Сельскохозяйственное рыбоводство: возможности развития и научное обеспечение инновационных процессов. Докл. Международной научно-практической конференции, ВНИИР, 5-7 сентября 2012 г. – Ногинск: ООО Типография Шерна, 2012. – С. 72-93.

10. Ананьев, В.И. Состояние исследований по разработке методов криоконсервации спермы, эмбрионов рыб и водных беспозвоночных / В.И. Ананьев, М.С. Манохина // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб: материалы Международной конференции, посвященной памяти профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова. – СПб.: ФГБНУ «ГосНИОРХ», 2013. – С. 7-22.

11. Ананьев, В.И. Координационная деятельность и управление комплексными научными разработками в области аквакультуры и сохранения биоразнообразия рыб / В.И. Ананьев // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2013а. – № 2. – С. 10-18.

12. Ананьев, В.И. Координационная деятельность и управление комплексными научными разработками в области аквакультуры и сохранения биоразнообразия рыб (часть 2) / В.И. Ананьев // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2013б. – № 3. – С. 3-11.

13. Андреев, А.А. Замерзание растворов антифризных веществ рыб и ракообразных / А.А. Андреев, Н.Н. Петропавлов // Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия. Биофизика живой клетки. – 1994. – Т. 6. – С. 65-67.
14. Андреев, А.А. Образование льда при замерзании криозащитных растворов / А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, Е.А. Назина, Э.Н. Гахова // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4. – С. 231-234.
15. Андреев, А.А. Кристаллизация криозащитных растворов и выживание спермиев рыб при криоконсервации / А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, Э.Н. Гахова, Т.Н. Пашкович, А.М. Тихомиров // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – № 5. – С. 869-875.
16. Андреев, А.А. Термомеханическое растрескивание и формирование микрочастиц льда при охлаждении криозащитных сред до температур жидкого азота / А.А. Андреев, Д.Г. Садикова, А.М. Тихомиров, А.В. Фирсова // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Материалы Международной заочной научно-практической конференции (24 марта 2014 г., Россия-Украина). – Сыктывкар, 2014. – С. 15-18.
17. Анохин, П.К. Очерки по физиологии функциональных систем / П.К. Анохин. – М.: Медицина, 1975. – 448 с.
18. Арефьев, В.А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / В.А. Арефьев, Л.А. Лисовенко. – Москва: Изд-во ВНИРО, 1995. – 407 с.
19. А.с. № 1814201 Способы оценки качества и отбора заводской молоди рыб // Л.В. Витвицкая, С.И. Никоноров, А.М. Тихомиров. Опубл. 11.11.1992. – 15 с.
20. Бапсанова, А.М. Криоконсервация генетического материала для сохранения редких и исчезающих видов животных / А.М. Бапсанова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 79.

21. Барабой, В.А. Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин, Ю.Б. Кудряшов. – СПб: Наука, 1992.– 148 с.
22. Белая, М.М. Научно-методические рекомендации по сохранению биологического разнообразия южных морей РФ с применением современных методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб / М.М. Белая, А.М. Тихомиров. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 14 с.
23. Белоус, А.М. Биохимия мембран. Кн. 3. Замораживание и криопротекция / А.М. Белоус, Е.А. Гордиенко, Л.Ф. Розанов. – М.: Высшая школа, 1987. – 80 с.
24. Белоус, А.М. Криобиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.
25. Белых, И.А. Воздействие низких температур и озона на ферментативную активность и структуру холинэстеразы / И.А. Белых, А.В. Сакун // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – 2009. – № 2. – С. 68-73.
26. Бизунок, С.Н. Вода в биологических системах и их компонентах / С.Н. Бизунок, Е.Н. Свентицкий. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. – 45 с.
27. Богатырева, М.М. Подбор криопротекторов для криоконсервации спермы русского осетра волжской популяции / М.М. Богатырева, Н.В. Болонина, Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров, М.Н. Сорокина // Биология – наука XXI века: Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 29 октября – 2 ноября 2007 г.). Сборник тезисов. – 2007. – С. 182.
28. Богатырева, М.М. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.06 / Богатырева Мария Михайловна. – Астрахань, 2010. – 20 с.
29. Богатырева, М.М. Организация криобанка спермы – перспективное направление в области сохранения генофонда осетровых рыб / М.М. Богатырева, Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров // Международная конференция «Осетровые

рыбы и их будущее»: сборник статей. 7-10 июня 2011 г., Бердянск, Украина. – 2011. – С. 101-104.

30. Богерук, А.К. Современное состояние и важнейшие задачи развития племенного рыбоводства в России / А.К. Богерук // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития: материалы Межд. науч.-практ. конф. (п. Рыбное, 3-6 сен. 2002 г.). – М.: ВНИРО, 2002. – С. 29-33.

31. Борода, А.В. Анализ изменений цитоскелета и связанных с ним белков в клетках моллюсков и иглокожих после криоконсервации при различных условиях / А.В. Борода, М.А. Майорова, Н.А. Одинцова // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 45-47.

32. Буцкая, Я.Л. Об особенностях функции семенника у рыб с различными типами нереста / Я.Л. Буцкая // Доклады АН СССР. – 1955. – Т. 100. – № 4. – С. 809-812.

33. Буцкая, Н.А. Фолликулярный эпителий семенников и особенности его функции, связанные с типом нереста (на примере окуневых) / Н.А. Буцкая // Зоологический журнал. – 1959. – Т. 38. – Вып. 12. – С. 1844-1850.

34. Васильева, Л.М. Современное состояние водных биоресурсов Волго-Каспийского бассейна / Л.М. Васильева // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2012. – № 1. – С. 83-86.

35. Васильева, Л.М. К вопросу сохранения и восстановления запасов осетровых рыб в Волго-Каспийском бассейне / Л.М. Васильева, Н.В. Смирнова, А.З. Юсупова // Юг России: экология, развитие. – 2012. – № 1. – С. 73-76.

36. Васильева, Л.М. Экологические аспекты сохранения водных биоресурсов Волго-Каспийского бассейна / Л.М. Васильева, М.В. Лозовская // Естественные науки. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2012. – № 1. – С. 26-31.

37. Васильева, Т.В. Современное состояние водных биоресурсов в Каспийском бассейне / Т.В. Васильева // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция. Астрахань, 18-19

сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – С. 29-37.

38. Вепринцев, В.Н. Сохранить генофонд рыб и водных беспозвоночных / В.Н. Вепринцев, С.А. Пилиев // Рыбное хозяйство. – 1989. – № 6. – С. 29-32.

39. Виленчик, М.М. Сколько лет можно хранить зародышевые клетки в криоконсервированном состоянии без существенного повреждения их генома / М.М. Виленчик // Консервация генетических ресурсов. – Пушино, 1983. – С. 1-21.

40. Витвицкая, Л.В. Оценка качества продукции рыбоводных заводов по эколого-физиологическим показателям / Л.В. Витвицкая, С.И. Никоноров, А.М. Тихомиров, А.В. Козлов // Фундаментальные науки – народному хоз-ву. Ан СССР. – М.: Наука, 1990. – С. 123-149.

41. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Франкса. – Киев: Наукова думка, 1985. – 388 с.

42. Габуда, С.П. Связанная вода. Факты и гипотезы / С.П. Габуда. – Новосибирск: Наука, 1982. – 159 с.

43. Гахова, Э.Н. Генетический криобанк как стратегия сохранения биоразнообразия водных беспозвоночных / Э.Н. Гахова // Биофизика живой клетки. – 1994. – Т. 6. – С. 21-27.

44. Гинзбург, А.С. Строение сперматозоида и акросомальная реакция стерляди *Acipenser stellatus* / А.С. Гинзбург // Проблемы экспериментальной биологии. – М.: Наука, 1977. – С. 246-256.

45. Гинзбург, А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии / А.С. Гинзбург. – М.: Наука, 1968. – 150 с.

46. Гордиенко, Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наукова думка, 1994. – 143 с.

47. Грунина, А.С. Диплоидный андрогенез у карпа / А.С. Грунина, Б.И. Гомельский, А.А. Нейфах // Генетика. – 1990. – Т. 26. – № 11. – С. 2037-2043.

48. Грунина, А.С. Индуцированный андрогенез у рыб: получение жизнеспособных ядерно-цитоплазматических гибридов / А.С. Грунина, А.В. Рекубрятский // Онтогенез. – 2005. – Т. 36. – № 3. – С. 256-266.

49. Грунина, А.С. Диспермный андрогенез у осетровых рыб: экспериментальное подтверждение возможности использования метода для восстановления исчезающих видов / А.С. Грунина, А.В. Рекубрятский, Л.И. Цветкова, А.Е. Барминцева, Е.Д. Васильева, К.В. Ковалев, О.Г. Полуэктова // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб: материалы Международной конференции, посвященной памяти профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова. – СПб.: ФГБНУ «ГосНИОРХ», 2013. – С. 156-168.

50. Грунина, А.С. Диспермный андрогенез с использованием криоконсервированной спермы как подход для восстановления осетровых / А.С. Грунина, Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, А.В. Рекубрятский // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии». – Сыктывкар, 2014. – С. 260-264.

51. Давыдова, Е.В. Кластерная кристаллизация водных растворов ПЭО-1500 / Е.В. Давыдова, А.И. Осецкий, В.И. Резников, С.С. Севастьянов // Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012 г. Проблемы криобиологии. – Т. 22. – № 3. – 2012. – С. 250.

52. Досаева, В.Г. Искусственное воспроизводство ценных видов рыб в Волго-Каспийском бассейне / В.Г. Досаева // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция. Астрахань, 18-19 сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – С. 267-272.

53. Дроздов, А.Л. Морфология гамет животных. Значение для систематики и филогенетики / А.Л. Дроздов, В.Н. Иванков. – М.: Круглый год, 2000. – 460 с.
54. Егоров, М.А. Организация криобанка генофонда ценной флоры и фауны юга России / М.А. Егоров // Современные наукоемкие технологии. – М.: Академия РАН, 2004а. – № 1. – С 54-55.
55. Егоров, М.А. О создании международного криобанка генофонда флоры и фауны Каспийского бассейна // Цитология. – СПб.: Наука.– 2004б. – Т. 46. – № 9. – С. 791-792.
56. Егоров, М.А. Развитие исследований по криосохранению: применение биопротектора на основе эписиннина / М.А. Егоров // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб: материалы Международной конференции, посвященной памяти профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова. – СПб.: ФГБНУ «ГосНИОРХ», 2013. – С. 188-192.
57. Егоров, С.В. Поведенческие реакции животных разных классов в раннем постнатальном развитии под влиянием некоторых факторов среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Егоров Сергей Владимирович. – Астрахань, 2004в. – 24 с.
58. Жмакин, А.И. Физические основы криобиологии / А.И. Жмакин // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178. – № 3.– С. 243-266.
59. Зацепина, Г.Н. Физические свойства и структура воды / Г.Н. Зацепина. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 172 с.
60. Иванов, В.П. Рыбные ресурсы Каспийского моря: история использования и проблемы сохранения / В.П. Иванов, В.И. Егорова // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция. Астрахань, 18-19 сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – С. 37-45.

61. Ивантер, Э.В. Введение в количественную биологию: учеб. пособие / Э.В. Ивантер, А.В. Коросов. – Петрозаводск: Изд-во Петр-ГУ, 2011. – 302 с.
62. Карамян, А.И. Эволюция интегративной деятельности мозга позвоночных / А.И. Карамян // Проблемы развития морфол. животных. – 1982. – С. 147-162.
63. Каранова, М.В. Антифризные свойства низкомолекулярных гликопротеинов из крови полярных рыб / М.В. Каранова // Биофизика живой клетки. – 1994. – Т. 6. – С 65-67.
64. Кононов, В.П. Термическое расширение воды как фактор криогенных повреждений сперматозоидов / В.П. Кононов, В.А. Багиров, Б.С. Иолчиев, П.М. Кленовицкий, Ш.Н. Насибов // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 10. – С. 42-44.
65. Копейка, Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа / Е.Ф. Копейка. – М.: Изд-во ВНИПРХ, 1986. – 11 с.
66. Копейка, Е.Ф. Качество криоконсервированной спермы сазанов после 25 лет хранения / Е.Ф. Копейка, С.И. Дрокин, В.В. Черепанов, О.Л. Безусый, Д. Сироватка, И.И. Грициняк // Сучасні проблеми теоретичної і іхтиології: тези IV Міжнар. іхтиологічн. наук-практич. конф. (Одеса, 7-11 вересня 2011 р.). – Одеса: Феникс, 2011. – С. 136-138.
67. Корчунов, А.А. Особенности развития репродуктивной системы и нереста стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) при выращивании в установках замкнутого водообеспечения: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.04.01 / Корчунов Александр Александрович. – Новосибирск, 2012. – 24 с.
68. Красильникова, А.А. Низкотемпературное консервирование сперматозоидов белорыбицы / А.А. Красильникова // II региональная конференция молодых ученых и инноваторов («Инно-Каспий»): сб. статей по итогам конф. (18-22 апреля 2011, Астрахань). – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. – С. 38-41.

69. Красильникова, А.А. Разработка методики низкотемпературного консервирования спермиев белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Gldenstdti, 1772) / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения: материалы Международной научной конференции (27 – 30 сентября 2011 г., Ростов-на-Дону). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 66-67.

70. Красильникова, А.А. Оптимизация методики криоконсервации спермиев рыб / А.А. Красильникова // VIII Ежегодная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: Тезисы докладов (11-26 апреля 2012 г., г. Ростов-на-Дону). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2012. – С. 55-56.

71. Красильникова, А.А. Опыт замораживания семенной жидкости осетровых рыб в виде «пленки» / А.А. Красильникова // IX Ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: тезисы докладов конференции (г. Ростов-на-Дону, 11-24 апр. 2013 г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – С. 38-39.

72. Красильникова, А.А. Эффективность криоконсервации сперматозоидов рыб при замораживании в контейнерах разных объемов / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров, Е.Н. Пономарева // Биология – наука XXI века: 17-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21-26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. – 2013. – С. 344.

73. Красильникова, А.А. Универсальная методика подбора проникающих криопротекторов для разных видов рыб / А.А. Красильникова // X Ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: тезисы докладов (г. Ростов-на-Дону, 14–29 апреля 2014 г.). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. – С. 25-26.

74. Красильникова, А.А. Совершенствование криобиологических подходов с целью повышения резистентности сперматозоидов рыб при низкотемпературном консервировании / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров // Материалы Международн. научн. конф. «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей», г. Ростов-на-Дону 1-3 октября 2014 г. – Изд-во ЮНЦ РАН, 2014а. – С. 193-196.

75. Красильникова, А.А. Зависимость концентрации проникающих криопротекторов от объемов «свободной незамерзающей» воды в спермиях различных видов рыб / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Материалы Международной заочной научно-практической конференции (24 марта 2014 г., Россия – Украина). – Сыктывкар, 2014б. – С. 50-54.

76. Красильникова, А.А. Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров // Естественные науки. – 2014в. – № 2. – С. 62-69.

77. Красильникова, А.А. Корреляция объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах и внутриклеточной жидкости сперматозоидов осетровых рыб / А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров // Естественные науки. – 2015. – № 3 (52). – С. 105-111.

78. Красная книга Ростовской области / Ю.Г. Арзанов, Г.Б. Бахтадзе, В.П. Белик, Н.И. Булышева, М.А. Динкевич, А.В. Забашта, Д.Г. Касаткин, А.А. Кондаков, В.А. Лужняк, А.В. Малиновкин, М.В. Набоженко, Р.М. Савицкий, В.В. Стахеев, Б.В. Страдомский, Е.Н. Терсков, Э.А. Хачиков, И.Б. Попов, З.Г. Пришутова, И.В. Шохин. – Т. 1 Животные (Издание второе). – Ростов-на-Дону, 2014.

79. Крупник, В.Д. Исследование влияния ультразвука на мембраны клеток / В.Д. Крупник, С.В. Мысик, В.Н. Ткаченко, В.В. Товстяк //

Взаимодействие ультразвука с биологической средой: Тез. докладов Всесоюзной конференции (Ереван, 1–4 июня 1983 г.). – М., 1983. – С. 43.

80. Крушинский, Л.В. Биологические основы рассудочной деятельности: эволюционные и физиолого-генетические аспекты поведения / Л.В. Крушинский. – М.: МГУ, 1986. – 270 с.

81. Кулешова, Л.Г. Влияние ряда криопротекторов на механизмы роста внеклеточных кристаллов льда / Л.Г. Кулешова // Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012 г. Проблемы криобиологии. – Т. 22. – № 3. – 2012. – С. 246.

82. Кухлинг, К. Справочник по физике / К. Кухлинг. – М.: Мир, 1985. – 520 с.

83. Кучков, В.Н. Активность воды как показатель связывания криопротектора с эритроцитами / В.Н. Кучков, В.Д. Зинченко // Доповіді Національної академії наук України. – 2010. – № 10. – С. 184-189.

84. Лепилина, И.Н. Особенности предличиночного развития севрюги в современных экологических условиях: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 11.00.11 / Лепилина Ирина Николаевна. – Астрахань, 2000. – 24 с.

85. Лепилина, И.Н. Состояние запасов каспийских осетровых в многолетнем аспекте (литературный обзор) / И.Н. Лепилина, Т.В. Васильева, А.С. Абдусаматов // Юг России: экология, развитие. – 2010. – № 3. – С. 57-65.

86. Лозина-Лозинский, Л.К. Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам / Л.К. Лозина-Лозинский. – Л.: Наука, 1972. – 288 с.

87. Матишов, Г.Г. Белорыбица и кумжа Каспийского бассейна / Г.Г. Матишов, В.П. Иванов, Г.М. Магомедов, С.В. Пономарев, Е.Н. Пономарева, П.А. Балыкин. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. – 84 с.

88. Матишов, Г.Г. Практическая аквакультура (разработки ЮНЦ РАН и ММБИ КНЦ РАН) / Г.Г. Матишов, Е.Н. Пономарева, Н.Г. Журавлева, В.А. Григорьев, В.А. Лужняк. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – 284 с.

89. Матишов, Г.Г. Сохранение генетического разнообразия рыб методами низкотемпературного консервирования / Г.Г. Матишов, Е.Н. Пономарева, М.М. Белая // Рыбное хозяйство. – 2012. – № 3. – С. 59-62.

90. Матишов, Г.Г. Справочник рыбовода. Инновационные технологии аквакультуры юга России / Г.Г. Матишов, С.В. Пономарев, Ю.М. Баканева, Н.В. Болонина, Ю.Н. Грозеску, А.А. Кокоза, В.М. Распопов, Е.Н. Пономарева, Ю.В. Федоровых, Л.Ю. Лагуткина, М.М. Белая, А.А. Бахарева, А.А. Красильникова. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 224 с.

91. Микодина, Е.В. Технологии аквакультуры как методы сохранения генетических ресурсов осетровых / Е.В. Микодина // Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры: доклады Международной научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 5-6 февраля 2013 г.). – М.: Изд-во РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, 2013. – С. 333-344.

92. Матишов, Г.Г. Состояние и перспективы развития биотехнологий аквакультуры на юге России / Г.Г. Матишов, Е.Н. Пономарева // Материалы международн. научн. конф. «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей» г. Ростов-на-Дону, 1-3 октября 2014. – Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. – С. 11-13.

93. Милованов, В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных: биолого-зоотехническая монография / В.К. Милованов. – М.: Изд-во с.-х. мет., журн. и плакатов, 1962. – 696 с.

94. Мусатова, И.Б. Фазовые переходы и стеклование в защитных средах для криоконсервирования меристем растений / И.Б. Мусатова, Н.А. Шевченко // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С.129-130.

95. Мюге, Н.С. Разработка методики оптимизации схем скрещивания и оценки эффективности работы осетровых рыбоводных заводов на основании результатов генетической паспортизации производителей / Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева // Международная конференция «Осетровые и их будущее». 7-10 июня 2011 г., Бердянск, Украина. Сборник статей. – Бердянск, 2011. – С. 148-150.

96. Назаренко, Л.В. Некоторые особенности криосохранения биологических объектов / Л.В. Назаренко // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия: Естественные науки. – 2008. – № 1. – С. 53-59.

97. Нардид, О.А. Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда / О.А. Нардид // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19. – № 2. – С. 177-185.

98. Невзоров, А.Н. О внутреннем механизме кристаллизации метастабильной водянистой воды и об его эффектах, влияющих на внутриоблачные процессы / А.Н. Невзоров // Изв. АН РАН Физ. Атм. и Океана. – 2006. – Т. 42. – № 6. – С. 830-838.

99. Невзоров, А.Н. Свойства метастабильных форм воды: новая интерпретация эксперимента / А.Н. Невзоров // Мир измерений. – № 8. – 2009. – С. 38-45.

100. Непомнящих, В.А. Чередование поведенческих тактик у карповых рыб в незнакомой обстановке / В.А. Непомнящих, Е.А. Осипова // Поведение рыб. Материалы докладов V Всероссийской конференции. 8–9 ноября 2014 г., Борок, Россия. – Кострома: Костромской печатный дом, 2014. – С. 186-191.

101. Никоноров, С.И. Эколого-генетические проблемы искусственного воспроизводства осетровых и лососевых рыб / С.И. Никоноров, Л.В. Витвицкая. – М.: Наука, 1993. – 251 с.

102. Никаноров, С.И. Низкотемпературные генетические банки, коллекционные рыбоводные хозяйства как необходимые компоненты сохранения биоразнообразия ихтиофауны России / С.И. Никаноров, В.И. Ананьев, В.Д. Артемов // Прудовое хозяйство. 2005. – № 2. – С. 19-22.

103. Одинцова, Н.А. Создание криобанка клеток и личинок морских беспозвоночных / Н.А. Одинцова, А.В. Борода, Н.М. Санина, Э.Я. Костецкий // Ветеринарная патология. – 2007. – № 3. – С. 254-256.

104. Орлов, Р.С. Нормальная физиология: учебник / Р.С. Орлов, А.Д. Ноздрачев. – 2010. – 832 с.

105. Пат. 2518442. Российская Федерация. МПК А 01 К, 61/00 (2006.01). С1. Способ создания репродуктивных маточных стад осетровых рыб / Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Ковалева А.В., Белая М.М.; заявитель и патентообладатель Южный научный центр Российской академии наук. – № 2012146207/13, заявл. 29.10.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16. – 8 с.

106. Пат. 2540598. Российская Федерация. МПК А 01 N, 1/02 (2006.01). С2. Способ снижения низкотемпературного скачка растворов криопротекторов / Андреев А.А., Садикова Д.Г., Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Белая М.М.; заявитель и патентообладатель Астраханский государственный технический университет (ФГБОУ ВПО АГТУ), Южный научный центр Российской академии наук (ФГБУН ЮНЦ РАН). – № 2013125414/13; заявл. 31.05.2013; опубл. 10.02.2015, Бюл. № 4. – 5 с.

107. Перов, Д.В. Оценка повреждений ДНК в спермиях белорыбицы при криоконсервации с использованием различных криозащитных растворов / Д.В. Перов, А.А. Андреев, Ю.Н. Лысенко, А.А. Красильникова, А.М. Тихомиров, А.Б. Гапеев // Биология – наука XXI века: 19-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. – 2015. – С. 107-108.

108. Персов, Г.М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток у осетровых / Г.М. Персов // ДАН СССР. – 1953. – Т. ХС. – № 6. – С. 1183-1185.

109. Подушка, С.Б. Кризис заводского воспроизводства в России и возможные пути его преодоления / С.Б. Подушка // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. – 2007. – № 12. – С. 5-15.

110. Пономарева, Е.Н. Результаты оплодотворения икры русского осетра и севрюги дефростированной спермой / Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, Н.В. Болонина // Мат. международной научно-практической конф.

«Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных», 25-26 октября 2007 г. – Дубровицы-Быково, ВНИИЖ, 2007. – С. 478-479.

111. Пономарева, Е. Н. Роль криобанка репродуктивного материала гидробионтов для поддержания биологического разнообразия и развития морских территорий: препринт-рекомендации / Е. Н. Пономарева, М.М. Богатырева, А.М. Тихомиров, Е.С. Джаригазов. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2009. – 44 с.

112. Пономарева, Е.Н. Формирование репродуктивных маточных стад осетровых рыб с целью повышения эффективности их воспроизводства в бассейнах Южных морей России / Е.Н. Пономарева, М.Н. Сорокина, В.А. Григорьев, А.А. Корчунов, Р.Б. Абсалямов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014а. – Т. 16. – № 1(4). – Самара: СамНЦ РАН, 2014а. – С.1172-1175.

113. Пономарева, Е.Н. Состояние и особенности товарной аквакультуры в южном макрорегионе России / Е.Н. Пономарева, М.Н. Сорокина, В.А. Григорьев // Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России: материалы Международной научной конференции (г. Ростов-на-Дону, 1-3 октября 2014 г.). – Ростов н/Д: Издательство ЮНЦ РАН, 2014б. – С. 232-236.

114. Пономарева, Е.Н. Методики криоконсервации яйцеклеток осетровых рыб для целей сохранения и восстановления их генофонда / Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров, А.В. Фирсова, А.А. Красильникова // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция, г. Астрахань, 18-19 сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань, Изд-во АГТУ, 2014с. – С. 317-323.

115. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99-121.

116. Пронина, Н.Д. Оценка качества криоконсервированной спермы рыб / Н.Д. Пронина // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов», СПб, 19-22 октября 2004. Цитология. – 2004. – Т. 46. – № 9. – С. 843-844.

117. Пронина, Н.Д. Криоконсервация половых продуктов рыб для сохранения исходной генетической и популяционной структуры / Н.Д. Пронина, Л.И. Цветкова, О.Б. Докина, В.А. Миленко // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб. Тезисы докладов Международной конференции. – СПб.: Нестор-История, 2010. – С. 176-177.

118. Пульвер, А.Ю. Комбинированный подход к разработке процедуры обратимого криосохранения крупных биологических объектов методом витрификации / А.Ю. Пульвер, И.В. Артюхов, В.И. Артюхов, А.В. Целиковский, Н.В. Шамаев, Н.А. Пульвер, А.Г. Перегудов // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 152-158.

119. Пушкарь, Н.Е. Введение в криобиологию / Н.Е. Пушкарь, А.М. Белоус. – Киев: Наукова Думка, 1975. – 342 с.

120. Рассадкин, Ю.П. Вода обыкновенная и необыкновенная / Ю.П. Рассадкин. – М.: Галерея СТО, 2008. – 840 с.

121. Рэ, Л. Консервация жизни холодом / Л. Рэ. – М., 1962. – 176 с.

122. Савушкина, С.И. Физиолого-биохимические показатели молоди карпа, полученной с использованием криоконсервированной спермы / С.И. Савушкина, Л.И. Цветкова, Л.Н. Титарева // Криоконсервация генетических ресурсов. Материалы 14 рабочего совещания, г. Пущино, 28-30 мая 1996 г. – Пущино, 1996. – С. 103-104.

123. Савушкина, С.И. Качество производителей сибирского осетра, при получении которых использована криоконсервированная сперма / С.И. Савушкина // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции

и 25-летию ее реорганизации в ГНУ ВНИИР. Сборник научных докладов. Т.2. – Москва, 11-13 апреля 2005 г. – Москва: ГНУ ВНИИ ирригационного рыбоводства, 2005. – С. 227-232.

124. Савушкина, С.И. Выращивание рыбопосадочного материала, полученного с использованием криоконсервированной спермы / С.И. Савушкина // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»: Международная научно-практическая конференция, Москва, 17-19 декабря 2007 г. – М., 2007. – С. 303-305.

125. Савушкина, С.И. Искусственное воспроизводство осетровых рыб с использованием криотехнологий / С.И. Савушкина // Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры: доклады Международной научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 5-6 февраля 2013 г.). – М.: Изд-во РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, 2013. – С. 429-440.

126. Садикова, Д.Г. Криоконсервация спермиев белорыбицы без использования криопротекторов / Д.Г. Садикова, Ф.И. Шинтимирова, А.М. Тихомиров, А.А. Андреев // Биология наука XXI века: 10-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых. Сборник тезисов. – Пущино, 2006. – С. 118-119.

127. Симонов, П.В. На стратегических направлениях изучения высшей нервной деятельности / П.В. Симонов // Ж. высш. нервной деятельности. – 1987. – Т. 37. – № 1. – С. 3-12.

128. Смирнова, Н.В. Современные подходы к сохранению популяции русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) / Н.В. Смирнова, А.Р. Лозовский, Л.М. Васильева // Естественные науки. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2012. – № 1. – С. 84-92.

129. Смит, О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения / О. Смит. – М.: Изд-во Иностранной литературы, 1963. – 568 с.

130. Тихомиров, А.М. Электростимуляция мембран спермиев русского осетра облегчает проникновение криопротекторов внутрь клеток / А.М. Тихомиров, Е.Н. Пономарева // Биофизика живой клетки. Консервация генетических ресурсов. – 2008. – Т. 9. – С. 129-130.

131. Тихомиров, А.М. Оптимизация методов криоконсервации половых продуктов ценных видов рыб / А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, Ю.А. Лапухин // Ихтиофауна Азово-Донского и Волго-Каспийского бассейнов и методы ее сохранения / под. общ. Редакцией академика Г.Г. Матишова. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2009. – С. 225-240.

132. Тихомиров, А.М. Разработка криозащитных сред для низкотемпературного консервирования сперматозоидов белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Güldenstädti, 1772) в целях сохранения генофонда / А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, А.А. Красильникова // Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. – № 1. – С. 58-62.

133. Тихомиров, А.М. Криоконсервация как способ сохранения редких и исчезающих видов рыб / А.М. Тихомиров // Интенсивная аквакультура на современном этапе развития: Научно-практическая конференция с международным участием, г. Махачкала, 1-4 октября 2013 г. – Махачкала: «Эко-пресс», 2013. – С. 203-207.

134. Тихомиров, А.М. Основы криобиологии. Курс лекций / А.М. Тихомиров. – Германия: Изд-во Lambert, 2014. – 354 с.

135. Тихомиров, А.М. Криоконсервация половых клеток рыб / А.М. Тихомиров. – Германия: Изд-во Lambert, 2015. – 295 с.

136. Тихонова, Э.Ю. Формирование жизненно важных органов веслоноса (*Polyodon spathula* Walbaum) в раннем онтогенезе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.10 / Тихонова Элеонора Юрьевна. – Астрахань, 2003. – 24 с.

137. Турдаков, А.Ф. Действие вещества икры и овариальной жидкости на сперматозоиды рыб / А.Ф. Турдаков // Вопросы ихтиологии. – 1965. – Т. 5. – Вып. 2 (35). – С. 302-314.

138. Турдаков, А.Ф. Влияние температурных условий на скорость движения и оплодотворяющую способность спермиев некоторых исыкульских рыб / А.Ф. Турдаков // Вопросы ихтиологии. – 1971. – Т. 11. – Вып. 2 (67). – С. 258-270.

139. Турдаков, А.Ф. Воспроизводительная система самцов рыб / А.Ф. Турдаков. – Фрунзе: Изд-во «ИЛИМ», 1972. – 280 с.

140. Фирсова, А. В. Криоконсервация икры осетровых рыб / А.В. Фирсова, А.М. Тихомиров // Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России: материалы Международной научной конференции (г.Ростов-на-Дону, 1-3 октября 2014 г.). – Ростов н/Д: Издательство ЮНЦ РАН, 2014. – С. 84-90.

141. Фишер, Р. Статистические методы для исследователей / Р. Фишер. – М.: Госстатиздат, 1954. – 267 с.

142. Хименков, А.Н. Введение в структурную криологию / А.Н. Хименков, А.В. Брушков. – М.: Наука, 2006. – 280 с.

143. Ходоревская, Р.П. Современное состояние запасов ценных промысловых видов рыб Каспийского моря и их перспективы в условиях нефтяных разработок углеводородного сырья / Р.П. Ходоревская // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений (11-13 октября 2011 г., Астрахань). – Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2011. – С. 259-264.

144. Ходоревская, Р.П. Состояние популяций каспийских осетровых и мораторий на их коммерческий вылов / Р.П. Ходоревская, А.Д. Власенко, И.Н. Лепилина // Сохранение биологических ресурсов Каспия. Международная научно-практическая конференция. Астрахань, 18-19 сентября 2014 года: материалы и доклады. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – С. 96-100.

145. Цветкова, Л.И. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб / Л.И. Цветкова, С.И. Савушкина, Л.Н. Титарева, О.Б. Докина, Н.Д. Пронина. – М.: ВНИИПРХ, 1997. – 11 с.

146. Цветкова, Л.И. Технология криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб / Л.И. Цветкова, О.Б. Докина, Н.Д. Пронина, В.А. Миленко // Сборник научно-технологической и методологической документации по аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО, 2001. – С. 152-158.

147. Цветкова, Л.И. Использование антифризных гликопротеинов при криоконсервации спермы рыб / Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, О.Б. Докина, М.В. Каранова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 2. – С. 57-59.

148. Цветкова, Л.И. Формирование низкотемпературного генного банка спермы рыб (состояние, развитие, перспективы) / Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, О.Б. Докина, А.В. Рекубратский, В.А. Парнышков // Вопросы рыболовства. – 2012. – Т. 13. – № 3 (51). – С. 538-545.

149. Цветкова, Л.И. Криобанк спермы рыб / Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, О.Б. Докина, А.В. Рекубратский, К.В. Ковалев // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 212-214.

150. Чебанов, М.С. Осетроводство в России: стратегия устойчивого развития / М.С. Чебанов, Е.В. Галич, Д.В. Ананьев // Международная конференция «Осетровые и их будущее». 7-10 июня 2011 г., Бердянск, Украина. Сборник статей. – Бердянск, 2011. – С. 197-201.

151. Чернов, А.С. Витрификация доимплантационных эмбрионов имбредных и нокаутных линий мышей SPF-категории / А.С. Чернов, А.А. Овсепян, Г.Б. Телегин // Биология – наука XXI века: 17-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21-26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. – 2015. – С. 375-376.

152. Чипинов, В.Г. Экономическая эффективность использования криоконсервированной спермы при выращивании осетровых видов рыб / В.Г. Чипинов, М.М. Богатырева // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения:

материалы Международной научной конференции (27-30 сентября 2011 г., Ростов-на-Дону). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 133-135.

153. Шинтимирова, Ф.И. Скорость охлаждения кардинально влияет на выживаемость спермиев осетра / Ф.И. Шинтимирова, Д.Г. Садикова, А.А. Андреев, А.М. Тихомиров // Биология наука XXI века: 10-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых. Сборник тезисов. – Пущино, 2006. – С. 123.

154. Шишанова, Е.И. Влияние криоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра / Е.И. Шишанова, И.В. Тренклер, А.С. Мамонова // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2012. – № 2. – С. 105-111.

155. Шишанова, Е.И. К вопросу об эффективности сохранения биологического разнообразия осетровых рыб в искусственных условиях / Е.И. Шишанова // Современные тенденции в сельском хозяйстве: II Международная научная Интернет-конференция: материалы конф. (Казань, 10-11 октября 2013 г.): в 2-х т. / Сервис виртуальных конференций RaX Grid; сост. Синяев Д.Н. – Казань: ИП Синяев Д.Н., 2013. – Т. 2. – С. 118-121.

156. Шмальгаузен, И.И. Основы сравнительной анатомии / И.И. Шмальгаузен. – М.: Сов. Наука, 1947. – 399 с.

157. Шмитова, Н.С. Роль тератозооспермии в неудачах программ вспомогательных репродуктивных технологий / Шмитова Н. С., Назаренко Р. В., Бедник Д. Ю., В. М. Здановский // Доктор.РУ. – 2014. – № 8-1(96). – С. 10-17.

158. Afzelius, B.A. Fine structure of the garfish spermatozoon / B.A. Afzelius // J. Ultrastruct. Res. – 1978. – V. 64. – P. 309-314.

159. Afzelius, B.A. The functional anatomy of the spermatozoon. Proceedings Elsevier Science / B.A. Afzelius. – 2013. – 406 p.

160. Alavi, S.M.H. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility / S.M.H. Alavi,

J. Cosson, M. Karami, H. Abdoulhay, B.M. Amiri // *Aqua Res.* – 2004a. – V. 35. – P. 1238-1243.

161. Alavi, S.M.H. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution rate, ions and osmolality / S.M.H. Alavi, J. Cosson, M. Karami, B.M. Amiri, M.A. Akhoundzadeh // *Reproduction.* – 2004b. – V. 128. – P. 819-828.

162. Alavi, S.M.H. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus* / S.M.H. Alavi, J. Cosson // *Aqua Res.* – 2005a. – V. 36. – P. 841-850.

163. Alavi, S.M.H. Sperm motility in fishes: (I) effects of pH and temperature / S.M.H. Alavi, J. Cosson // *Cell Biol. Int.* – 2005b. – V. 29. – P. 101-110.

164. Alavi, S.M.H. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmotic pressure / S.M.H. Alavi, J. Cosson // *Cell Biol. Int.* – 2006. – V. 30. – P. 1-14.

165. Alavi, S.M.H. Fish spermatology: implication for aquaculture management / S.M.H. Alavi, O. Linhart, K. Coward, M. Rodina // *Fish spermatology.* – Oxford, Alpha Science Ltd, 2008. – P. 397-460.

166. Alavi, S.M.H. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.) / S.M.H. Alavi, M. Rodina, A.T.M. Viveiros, J. Cosson, D. Gela, S. Boryshpolets, O.Linhart // *Theriogenology.* – 2009. – V. 72. – P. 32-43.

167. Alavi, S.M.H. Roles of osmolality, calcium-potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm / S.M.H. Alavi, D. Gela, M. Rodina, O. Linhart // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2011. – V. 160A. – P. 166-174.

168. Alavi, S.M.H. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics / S.M.H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, O. Linhart // *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* – 2012a. – V. 22. – Iss. 3. – P. 695-717.

169. Alavi, S.M.H. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II). Sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation / S.M.H. Alavi, A. Hatef, M. Pšenička, V. Kašpar, S. Boryshpolets, B. Dzyuba, J. Cosson, V. Bondarenko, M. Rodina, D. Gela, O. Linhart // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. – 2012b. – V. 22. – Iss. 3. – P. 861-886.
170. Alavi, S.M.H. Protease in sturgeon sperm and the effects of protease inhibitors on sperm motility and velocity / S.M.H. Alavi, P. Postlerová-Maňásková, A. Hatef, M. Pšenička, J. Pěknicová, K. Inaba, A. Ciereszko, O. Linhart // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2014. – V. 40. – Iss. 5. – P. 1393-1398.
171. Ali, J. Development of vitrification solutions / J. Ali, J. Shelton // *Vitrification in Assisted Reproduction*. – London, UK: Informa Healthcare, 2007. – P. 45-63.
172. Arakawa, T. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis / T. Arakawa, J.F. Carpenter, Y.A. Kita, J.H. Crowe // *Cryobiology*. – 1990. – V. 27. – Iss. 4. – P. 401-415.
173. Ashwood-Smith, M.J. Lethal and chromosomal effect of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulfoxide / M.J. Ashwood-Smith, G.B. Friedmann // *Cryobiology*. – 1979. – № 16. – P. 132-140.
174. Ashwood-Smith, M.J. Low temperature preservation of cells, tissues and organs, // *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. – Tunbridge Wells, Kent: Pitman Medical Ltd., 1980. – P. 19.
175. Asturiano, J.F. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods of the cryopreservation of *European eel* sperm / J.F. Asturiano, L. Perez, D.L. Garzon, F. Marco-Jimenez, D.S. Penaranda, J.S. Vicente, M. Jover // *Fish Physiol. and Biochem.* – 2004. – V. 30. – № 3-4. – P. 283-293.
176. Безусий, О.Л. Вивчення впливу кріоконсервування сперми на розвиток молоді українських порід коропа / О.Л. Безусий, В.О. Черепнін, В.В. Бех,

Е.Ф. Копейка, С.І. Дрокин // Рибогосподарська наука України. – 2010. – № 4. – С. 95-100.

177. Baccetti, B. Evolutionary trends in sperm structure / B. Baccetti // *Comp. Biochem. Physiol. A comp. Physiol.* – 1986. – V. 85. – P. 29-36.

178. Baeza, R. Fatty acid mobilization in male European eels during induced sexual maturation. Effect of thermal regime and relation with sperm quality parameters / R. Baeza, I. Mazzeo, M.C. Vílchez, V. Gallego, D.S. Peñaranda, L. Pérez, J.F. Asturiano // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 22-23.

a. Beirão, J. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations / J. Beirão, E. Cabrita, S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, M.P. Herráez // *Cryobiology.* – 2011. – V. 62. – P. 22–31.

179. Beirão, J. Semen biology and the effects of salinity on sperm activation in two osmerids with different spawning behaviors / J. Beirão, J. Lewis, C.F. Purchase // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 50-51.

180. Billard, R. Biology of sperm and artificial reproduction in carp / R. Billard, J. Cosson, G. Perchec, O. Linhart // *Aquaculture.* – 1995. – V. 129. – P. 95-112.

181. Billard, R. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa / R. Billard, J. Cosson, F. Fierville, R. Brun, T. Rouault, P. Williot // *J. Appl. Ichthyol.* – 1999. – V. 15. – P. 199-203.

182. Billard, R. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility / R. Billard, J. Cosson, O. Linhart // *Aquac. Res.* – 2000. – V. 31. – P. 283–287.

183. Bishop, D.W. Biology of spermatozoa / D.W. Bishop // *Sex and internal secretion.* – 1961. – P. 707-796.

184. Boisson, C. Troisieme note sur la spermiogenese de *Protopterus annectens* (Dipneuste) du Senegal / C. Boisson, C. Mattei, X. Mattei // Bull. Inst. Fondam. Afr. Noire Ser. A, Sci. Nat. – 1967. – V. 29. – P. 1097-1107.
185. Bondarenko, V. Information gained from high speed video images of swimming fish spermatozoa / V. Bondarenko, J. Cosson // Международная конференция «Осетровые и их будущее». 7-10 июня 2011 г., Бердянск, Украина. Сборник статей. – Бердянск, 2011. – С. 6-8.
186. Bouvet, V. Antifreeze glycoproteins / V. Bouvet, R.E. Ben // Cell Biochem. Biophys. – 2003. – V. 39. – Iss. 2. – P. 133-144.
187. Branham, J.M. Movements of free-swimming rabbit spermatozoa / J.M. Branham // Journal Reproduction Fertility. – 1969. – V. 18. – P. 97-105.
188. Bronzi, P. Global sturgeon aquaculture production:an overview / P. Bronzi, H. Rosenthal, J. Gessner // J. Appl Ichthyol. – 2011. – V. 27. – P. 169-175.
189. Bryant, G. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: The various effects of solutes / G. Bryant, K.L. Koster, J. Wolfe // Seed Sci. Res. – 2001. – V. 11. – P. 17-25.
190. Cabrita, E. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives / E. Cabrita, C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirão, S. Pérez-Cerezales, M.P. Herráez // Journal of Applied Ichthyology. – 2010. – V. 26. – Iss. 5. – P. 623-635.
191. Cardona-Costa, J. Vitrification of caudal fin explants from zebrafish adult specimens / J. Cardona-Costa, J. Roig, M. Perez-Camps, F. Garcia-Ximenez // Cryoletters. – 2006. – V. 27. – P. 329-332.
192. Cardona-Costa, J. Vitrification of zebrafish embryo blastomeres in microvolumes / J. Cardona-Costa, F. Garcia-Ximenez // Cryoletters. – 2007. – V. 28. – P. 303-308.
193. Cardona-Costa, J. Can vitrified zebrafish blastomeres be used to obtain germ-line chimeras? / J. Cardona-Costa, M. Francisco-Simao, F. Garcia-Ximenez // Cryoletters. – 2009. – V. 30. – P. 422-428.

194. Cejko, B.I. Biochemical factors of common carp *Cyprinus carpio* L. seminal plasma and its relationship with sperm motility parameters / B.I. Cejko, S. Krejszeff, B. Sarosiek, D. Źarski, S. Judycka, K.R. Kowalski // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 78-79.
195. Chen, G. Ice-binding surface of fish type III antifreeze / G. Chen, Z. Jia // *Biophys J.* – 1999. – V. 77. – P. 1602-1608.
196. Chen, S. L. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. / S. L. Chen, Y. S. Tian // *Theriogenology.* – 2005. – V. 63. – P. 1207-1219.
197. Chen, S. U. Vitrification of oocytes: various procedures / S.U. Chen, Y.S. Yang // *Vitrification in Assisted Reproduction.* – London, UK: Informa Healthcare, 2007. – P. 129-144.
198. Cheng, C.-H.C. Freezing avoidance in polar fishes / C.-H.C. Cheng, // *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) - Theme 6.73 Extremophiles* (Ed. C. Gerday), developed under the auspices of the UNESCO. – U.K.: Eolss Publishers, 2003.
199. Cherr, G.N. Acrosome reactions in sperm from the white sturgeon *Acipenser transmontanus* / G.N. Cherr, W.N. Clark // *J. Exp. Zool.* – 1984. – V. 232. – P. 129-139.
200. Cherr, G.N. Gamete interaction in the white sturgeon *Acipenser transmontanus*: a morphological and physiological review / G.N. Cherr, W.N. Clark // *Environ. Biol. Fishes.* – 1985. – V. 14. – P. 11-22.
201. Cherr, G.N. An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* / G.N. Cherr, H. Wallis, Jr. Clark // *Journal of Experimental Zoology.* – 2005. – V. 232. – Iss. 1. – P. 129-139.
202. Choi, J.H. Proceedings of the ASME Fluids Engineering Division—2004 / J.H. Choi, B. Han, J.C. Bischof // Presented at 2004 ASME International Mechanical

Engineering Congress and Exposition: November 13-19, 2004, Anaheim, California, USA. – 2004. – P. 1.

203. Ciereszko, A. Identification of trypsin-like activity in sturgeon spermatozoa / A. Ciereszko, K. Dabrowski, F. Lin, S. Doroshov // J. Exp. Zool. – 1994. – V. 268. – P. 486-491.

204. Ciereszko, A. Characterization of acrosin-like activity of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa / A. Ciereszko, K. Dabrowski, S.I. Ochkur // Mol. Reprod. Dev. – 1996. – V. 45. – P. 72-77.

205. Ciereszko, A. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum) / A. Ciereszko, K. Dabrowski, S.D. Mims, J. Glogowski, // Comp. Biochem. Physiol. – 2000. – V. 125B. – P. 197-203.

206. Connor, W. Cryoprotection of mammalian cells in tissue cultures with polymers; possible mechanisms / W. Connor., M.J. Ashwood-Smith // Cryobiology. – 1973. – № 10. – P. 488-496.

207. Cosson, J. Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa: effects of potassium and pH on motility / J. Cosson, O. Linhart // Folia Zool. – 1996. – V. 45. – P. 361-370.

208. Cosson, J. Ionic factors regulating the motility of fish sperm / J. Cosson, R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno, M. Suquet // The male gamete: from basic to clinical applications. – Vienna: Cache Rive Press, 1999. – P. 161-186.

209. Cosson, J. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa / J. Cosson, O. Linhart, S. Mims, W. Shelton, M. Rodina // J. Fish Biol. – 2000. – V. 56. – P. 1348-1367.

210. Cosson, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence / J. Cosson // J. Fish Biol. – 2010. – V. 76. – P. 240-279.

211. Cosson, J. Fish spermatozoa motility, physical and bio-energetic interactions with their surrounding media / J. Cosson // Sperm Cell Research in the 21st

Century: Historical Discoveries to New. – Horizons, Tokyo: Adthree Publishing Co., Ltd., 2012. – P. 152-156.

212. Cosson, J. ATP: the sperm movement energizer / J. Cosson // Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. – Nova Science Publishers Inc., 2013. – P. 1-46.

213. Cosson, J. Energetic aspects of fish sperm motility / J. Cosson, P. Fedorov, V. Dzyuba // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 36-37.

214. Cosson, J. Plasticity of flagella shape during fish sperm motility / J. Cosson, G. Prokopchuk // Aquaculture Europe 2014. Abstracts. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014a. – P. 276-277.

215. Cosson, J. Wave propagation in flagella / J. Cosson, G. Prokopchuk // Wave propagation. – Cheyenne, WY 82001, USA: AcademyPublish.org (Publishing Services LLC), 2014b. – P. 541-583.

216. Davies, P.L. Structure and function of antifreeze proteins / P.L. Davies, J. Baardsnes, M.J. Kuiper, V.K. Walker // Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B. – 2002. – V. 357. – P. 927-935.

217. Devireddy, R.V. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents / R.V. Devireddy, D.J. Swanlund, K.P. Roberts, J.C. Bischof. // Biol. Reprod. – 1999. – V. 61. – P. 764-775.

218. Devireddy, R.V. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing / R.V. Devireddy, D.J. Swanlund, K.P. Roberts, J.L. Pryor, J.C. Bischof // Hum. Reprod. – 2000. – V. 15. – P. 1125-1135.

219. DiLauro, M.N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) / M.N. DiLauro, W. Kaboord, R.A. Walsh // Can. J. Zool. – 1998. – V. 76. – P. 1822-1836.

220. DiLauro, M.N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. II. The shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*, Lesueur, 1818) / M.N. DiLauro, W.S. Kaboord, R.A. Walsh // *Can. J. Zool.* – 1999. – V. 77. – P. 321-330.
221. DiLauro, M.N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeon. III. The Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817) / M.N. DiLauro, W.S. Kaboord, R.A. Walsh // *Can. J. Zool.* – 2000. – V. 78. – P. 438-447.
222. DiLauro, M.N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. IV. The pallid sturgeon (*Scaphirhynchus albus* Forbes and Richardson, 1905) / M.N. DiLauro, R.A. Walsh, M. Peiffer // *Can. J. Zool.* – 2001. – V. 79. – P. 802-808.
223. Ding, F. H. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos / F.H. Ding, Z.Z. Xiao, J. Li // *Theriogenology.* – 2007. – V. 68. – P. 702-708.
224. Du, N. Mechanism of antifreeze by antifreeze protein / N. Du, X.Y. Liu, Ch.L. Hew // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 36000-36004.
225. Duijn, C.V. *Nature* / C.V. Duijn, J.H. Lierpor. – London, 1966. – V. 211. – P. 1313-1315.
226. Duijn, C.V. *Ann. biol. anim., biophys* / C.V. Duijn. – 1967. – V. 7. – P. 331-342.
227. Dzuba, B.B. Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation / B.B. Dzuba, E.F. Kopeika, V.V. Cherepanov, S.I. Drokin // *J. Appl. Ichthyol.* – 1999. – V. 15. – P. 312.
228. Dzyuba, B. Successive activations of sturgeon sperm motility by osmolality and Ca²⁺ concentration / B. Dzyuba, J. Cosson, V. Dzyuba, M. Rodina, D. Gela, O. Linhart // 3rd International Workshop on the of Fish Gametes. Final Programme and Book of Abstracts. Budapest, Hungary, September 7-9. – 2011. – P. 138-139.
229. Dzyuba, B. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping / B. Dzyuba, S. Boryshpolets, A. Shaliutina, M. Rodina, G. Yamaner, D. Gela, V. Dzyuba, O. Linhart // *Aquaculture.* – 2012. – V. 356–357. – P. 272-278.

230. Dzyuba, V. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response / V. Dzyuba, J. Cosson // *Reproductive Biology*. – 2014. – V. 14. – Iss. 3. – P. 165-175.
231. Edashige, K. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification / K. Edashige, D.M. Valdez, T. Hara, N. Saida, S. Seki, M. Kasai // *Cryobiology*. – 2006. – V. 53. – P. 96-106.
232. Eroglu, A. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells / A. Eroglu, M. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, M. Toner // *Nature Biotech.* – 2000. – V. 18. – P. 163-167.
233. Fabbrocini, A. Sperm motility evaluation on long-term storage (5 years) of sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved semen / A. Fabbrocini, R. D’Adamo, S. Pelosi, L.F.J. Oliveira, F. Del Prete, F. Silvestri, V. Vitiello, G. Sansone // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 162-163.
234. Fahy, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology / G.M. Fahy // *Cryobiology*. – 1986. – V. 23. – P. 1-13.
235. Fahy, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization / G.M. Fahy // *Cryobiology*. – 2010. – V. 60. – P. 45-53.
236. Gallego, V. Role of intracellular changes in calcium, potassium and ph in the initiation of european eel sperm motility / V. Gallego, F. Martínez-Pastor, I. Mazzeo, D.S. Peñaranda, M.P. Herráez, J.F. Asturiano, L. Pérez // 3rd International Workshop on the of Fish Gametes. Final Programme and Book of Abstracts. Budapest, Hungary, September 7-9. – 2011. – P. 73-74.
237. Gallego, V. Sperm quality parameters and spermatozoa morphometric characterization of marine species: an evolutionary approach from invertebrates to vertebrates / V. Gallego, L. Violi, L. Pérez, J.F. Asturiano, M. Yoshida // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira,

Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 88-89.

238. Gallego, V. Sperm motility parameters and spermatozoa morphometric characterization in marine species: A study of swimmer and sessile species / V. Gallego, L. Pérez, J.F. Asturiano, M. Yoshida // *Theriogenology*. – 2014. – V. 82. – Iss. 5. – P. 668-676.

239. Gallis, J.L. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility / J.L. Gallis, E. Fedrigo, P. Jatteau, E. Bonpant, R. Billard // *Acipenser*. – Bordeaux: Cemagref, 1991. – P. 143-151.

240. Gibbons, B.H. Structure and motility of the 9+0 flagellum of eel spermatozoa / B.H. Gibbons, I.R. Gibbons, B. Baccetti // *Journal of Submicroscopic Cytology*. – 1983. – V. 15. – P. 15-20.

241. Gibbons, B.H. Live and reactivated motility in the 9+0 flagellum of *Anguilla* sperm / B.H. Gibbons, B. Baccetti, I.R. Gibbons // *Cell Motil. Cytoskeleton*. – 1985. – V. 5. – P. 333-350.

242. Gillies, A. Fins improve the swimming performance of fish sperm: a hydrodynamic analysis of the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* / A. Gillies, V. Bondarenko, J. Cosson, A. Pacey // *Cytoskeleton*. – 2013. – V. 70. – Iss. 2. – P. 85-100.

243. Gilmore, J.A. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods / J.A. Gilmore, J. Liu, E.J. Woods, A.T. Peter, J.K. Critser // *Human Reproduction*. – 2000. – V. 15. – P. 335-343.

244. Giraud, M.N. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa / M.N. Giraud, C. Motta, D. Boucher, G. Grizard // *Hum Reprod*. 2000. – V. 15. – P. 2160-2164.

245. Graether, S.P. Beta-Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect / S.P. Graether, M.J. Kuiper, S.M. Gagné, V.K Walker., Z. Jia, B.D. Sykes, P.L. Davies // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 325-328.

246. Grier, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes / H.J. Grier // Amer. Zool. – 1981. – V. 21. – P. 345-357.
247. Griffith, M. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta / M. Griffith, C. Lumb, S.B. Wiseman, M. Wisniewsky, R. Johnson, A. Marangoni // Plant Physiol. – 2005. – V. 138. – P. 330-340.
248. Grunina, A.S. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of and androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm / A.S. Grunina, A.V. Recoubratsky, L.I. Tsvetkova, V.A. Barmintsev // Int. J. Refrig. – 2006. – V. 29. – № 3. – P. 379-386.
249. Guan, M. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification / M. Guan, D.M. Rawson, T. Zhang // Cryoletters. – 2010. – V. 31. – P. 230-238.
250. Guenther, J.F. Extra- and intra-cellular ice formation in Stage I and II *Xenopus laevis* oocytes / J.F. Guenther, S. Seki, F.W. Kleinhans, K. Edashige, D.M. Roberts, P. Mazur // Cryobiology. – 2006. – V. 52. – P. 401-416.
251. Guha, T. Ultrastructure of testicular spermatozoon of the fish *Oreochromis niloticus* / T. Guha, A.Q. Siddiqui, P.F. Prentis // Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America. – San Francisco: San Francisco Press, 1988. – P. 278-279.
252. Han, B. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing / B. Han, J.C. Bischof // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48. – № 1. – P. 8-21.
253. Hann, H.W. Variation in spermatogenesis in the teleost family Cottidae / H.W. Hann // J. Morph. Physiol. – 1930. – V. 50. – № 2. – P. 303-411.
254. Hara, M. An ultrastructural review of the spermatozoa of Japanese fishes / M. Hara., M. Okiyana // Bull. Ocean Res. Inst. Univ. Tokyo. – 1998. – № 33. – P. 1-138.
255. Harvey, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mosanbicus* spermatozoa / B. Harvey // Aquaculture. – 1983. – V. 32. – P. 313-320.

256. Hatef, A. Morphology and fine structure of *Acipenser percus* (Acipenseridae, Chondrostei) spermatozoon: interspecies comparison in Acipensiformes. / A. Hatef, S.M.H. Alavi, S.H. Noveiri, H. Poorbagher, A.R. Alipour, M. Pourkazemi, O. Linhart // Anim. Reprod. Sci. – 2011. – V. 123. – P. 81-88.

257. Hatef, A. Morphology and fine structure of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae, Chondrostei) spermatozoa / A. Hatef, S.M.H. Alavi, M. Rodina, O. Linhart // J. Appl. Ichthyol. – 2012. – V. 28. – P. 978-983.

258. Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen / W.V. Holt // Anim. Reproduct. Sci. – 2000. – Vol. 62. – № 1-3. – P. 3-22.

259. Hopkins, J.B. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions / J.B. Hopkins, R. Badeau // Cryobiology. – 2012. – V. 65 (3). – P. 169-178.

260. Ingermann, R.L. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) / R.L. Ingermann, M. Holcomb, M.L. Robinson, J.G. Cloud // J. Exp. Biol. – 2002. – V. 205. – P. 2885-2890.

261. Isachenko, E. Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa / E. Isachenko, V. Isachenko, I.I. Katkov, R. Sanchez, H. van der Ven, F. Nawroth // Vitrification in Assisted Reproduction. – London, U.K: Informa Healthcare, 2007. – P. 87-105.

262. Jamieson, B.G.M. Fish evolution and systematic evidence from spermatozoa / B.G.M. Jamieson. – Cambridge: Cambridge University Press, 1991. – P. 230-295.

a. Jamieson, B.G.M. Spermatozoal phylogeny of the vertebrata / B.G.M. Jamieson // The male gamete: from basic science to clinical applications. – Vienna: Cache River Press, 1999. – P. 303-331.

263. Jamieson, B.G.M. Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes). Part 1. Phylogeny, Reproductive System, Viviparity, Spermatozoa / B.G.M. Jamieson. – Enfield: Science Publishers, 2009. – 802 p.

264. Jespersen, A. Fine structure of the spermatozoon of the Australian Lungfish *Neoceratodus fosteri* (Kreffft) / A. Jespersen // Journal of Ultrastructure Research. – 1971. – V. 37. – P. 178-185.
265. Jespersen, A. Spermiogenesis in *Anaspides tasmariae* (Thomson) (Crustacea, Malacostraca, Syncarida) / A. Jespersen // Acta Zool. (Stockh.). – 1983. – V. 64. – № 1. – P. 3916.
266. Kasa, E. Vitrification of the sperm of European eel *A. anguilla*: investigation of different protocols / E. Kasa, M.C. Vilchez, M. Morini, D.S. Penaranda, L. Perez, J.F. Asturiano, B. Urbanyi, A. Horvath // Aquaculture Europe 2014. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014. – P. 616-617.
267. Katkov, I.I. High temperature stabilization by drying and storage at ambient temperature as an emerging alternative to transgenic animal sperm cryobanking / I.I. Katkov, A.B.-T. Ali, Y. Agca // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб: материалы Международной конференции, посвященной памяти профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова. – СПб.: ФГБНУ «ГосНИОРХ», 2013. – С. 228-236.
268. Kelley, J.L. Functional diversification and evolution of antifreeze proteins in the antarctic fish *Lycodichthys dearborni* / J.L. Kelley, J.E. Aagaard, M.J. MacCoss, W.J. Swanson // Journal of Molecular Evolution. – 2010. – V. 71. – Iss. 2. – P. 111-118.
269. Khalili, M.A. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification: impacts on sperm parameters and apoptosis / M.A. Khalili, M. Adib, M. Ramezani // Fertility and Sterility. – 2010. – V. 94. – P. 108.
270. Khlebovich, V.V. On various types of antifreezes in active and resting stages of organisms / V.V. Khlebovich // Hydrobiologia. – 1996. – V. 320. – № 1-3. – P. 81-82.
271. Krasilnikova, A.A. Alternative methods of preparation of fish sperm to freeze at ultra-high values of cooling rate / A.A. Krasilnikova, A.M. Tikhomirov //

Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – № 2. – С. 72-78.

272. Kuleshova, L.L. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs / L.L. Kuleshova, S.S. Gouk, D.W. Hutmacher // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28. – P. 1585-1596.

273. Lahnsteiner, F. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. / F. Lahnsteiner, B. Berger, A. Horvath, B. Urbanyi // *Aquac. Res.* – 2004. – V. 35. – P. 519-528.

274. Lahnsteiner, F. Sperm morphology and ultrastructure in fish / F. Lahnsteiner, R.A. Patzner // *Fish Spermatology*. – Oxford, UK: Alpha Science Ltd, 2008. – P. 1-62.

275. Legendre, M. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing / M. Legendre, R. Billard // *Reprod. Nutr. Develop.* – 1980. – V. 20. – P. 1859-1868.

276. Leung, L.K.P. Fish spermatology. Ultrastructure, phylogeny and cryopreservation / L.K.P. Leung // Honours thesis. – Brisbane: Univ. of Queensland, 1987. – P. 245-256.

277. Li, S.-Zh. Dongwuxue zazhi / S.-Zh. Li, Y. Guo, L.-G. Cai, W. Gu, R.-M. Zhang, Y.-W. Ma, E.-X. Tuy // *Chin. J. Zool.* – 2005. – V. 40. – № 4. – P. 82-85.

278. Linhart, O. Fish sperm composition and biochemistry / O. Linhart, V. Slechta, A. Slavik // *Bull. Inst. Zool., Acad. Sin, Monogr.* – 1991. – V. 16. – P. 285-311.

279. Linhart, O. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platorynchus*, and Paddlefish, *Polyodon spathula* / O. Linhart, S.D. Mims, W.L. Shelton // *J. Fish Biol.* – 1995. – V. 47. – P. 902-909.

280. Linhart, O. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa / O. Linhart, J. Cosson, S.D. Mims, W.L. Shelton, M. Rodina // *Reproduction*. – 2002. – V. 124. – P. 713-719.

281. Linhart, O. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) seminal fluid / O. Linhart, S.D. Mims, B. Gomelsky, A.E.

Hiott, W.L. Shelton, J. Cosson, M. Rodina, D Gela, J. Bastl // Aqua Int. – 2003a. – V. 11. – P. 357-368.

282. Linhart, O. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.) / O. Linhart, M. Rodina, J. Bastl, J. Cosson // J. Appl. Ichthyol. – 2003b. – V. 19. – P. 177-181.

283. Linhart, O. Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa / O. Linhart, S.D. Mims, B. Gomelsky, L.I. Cvetkova, J. Cosson, M. Rodina, A. Horvath, B. Urbanyi // J. Appl. Ichthyol. – 2006. – V. 22. – P. 389-394.

284. Linhart, O. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) / O. Linhart, S.M.H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, J. Cosson // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – V. 24. – P. 386-392.

285. Linhartova, Z. Morphology and ultrastructure of beluga (*Huso huso*) spermatozoa and a comparison with related sturgeons / Z. Linhartova, M. Rodina, J. Nebesarova, J. Cosson, M. Psenicka // Animal Reproduction Science. – 2013a. – V. 137. – P. 220-229.

286. Linhartova, Z. Ultrastructure of beluga (*Huso huso*) spermatozoa and a comparison with related sturgeons / Z. Linhartova, M. Rodina, J. Nebesarova, J. Cosson, M. Psenicka // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013b. – P. 64-65.

287. Liu, Y. Ionic activation of sperm motility in an endangered viviparous fish / Y.Liu, H. Yang, Tiersch T.R. // Aquaculture America-2015. 19-22 of February 2015. New Orleans, Louisiana. Book of abstract. – 2015. – P. 283.

288. Lovelock, J.E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells / J.E. Lovelock // Proc. Roy. Soc. Med. – 1954. – V. 47. – P. 60.

289. Luyet, B. J. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air / B.J. Luyet, E.L. Hodapp // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1938. – V. 39. – P. 433-434.
290. Luyet, B. Sur la survie des poissons plongés dans l'air liquid / B. Luyet // Societe de Biologie Comptes Rendus. – 1938. – V. 127. – P. 788-790.
291. Luyet, B. Life and death at low temperatures / B. Luyet, M. Gehenio // Biodynamica. Normandy, MO. – 1940. – P. 61.
292. Magyary, I. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm I. The importance of oxygen supply / I. Magyary, B. Urbanyi, L. Horvath // Journal of Applied Ichthyology. – 1996. – V. 12. – P. 113-115.
293. Martinez-Paramo, S. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential / S. Martinez-Paramo, S. Perez-Cerezales, F. Gomez-Romano, G. Blanco, J.A. Sanchez, M.P. Herraiez // Theriogenology. – 2009. – V. 71. – P. 594-604.
294. Matishov, G.G. The state and development prospects of aquaculture biotechnologies in the South of Russia / G.G. Matishov, E.N. Ponomareva // Aquaculture Europe 2014. Abstracts. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014. – P. 799-800.
295. Matishov, G.G. Development prospects of aquaculture biotechnology in the South of Russia / G.G. Matishov, E.N. Ponomareva // Aquaculture America-2015. 19-22 of February 2015. New Orleans, Louisiana. Book of abstract. – 2015. – P. 306.
296. Ponomareva, E.N. Storied technologies as perspective direction of aquabioculture in the South of Russia / E.N. Ponomareva, G.G. Matishov, V.A. Grigor'ev // Aquaculture America-2015. 19-22 of February 2015. New Orleans, Louisiana. Book of abstract. 2015. – P. 378.
297. Matsumoto, S. Effects of synthetic antifreeze glycoprotein analogue on islet cell survival and function during cryopreservation / S. Matsumoto, M. Matsusita, T. Morita, H. Kamachia, S. Tsukiyama, Y. Furukawa, S. Koshida, Y. Tachibana, S. Nishimura, S. Todo // Cryobiology. – 2006. – V. 52. – Iss. 1. – P. 90-98.

298. Mattei, C. La spermiogenese d'un poisson teleosteen (*Lapadogaster lapadogaster*). II-Le spermatozoide / C. Mattei, X. Mattei // *Biologie Cellulaire*. – 1978. – V. 32. – P. 267-274.
299. Mattei, C. Reinvestigation de la structure des flagelles spermatiques: cas particulier des spermatozoides a mitochondrie annulaire / C. Mattei, X. Mattei, B. Marchand, R. Billard // *Journal of Ultrastructure Research*. – 1981. – V. 74. – P. 307-312.
300. Mattei, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes / X. Mattei // *Canad. J. Zool.* – 1991. – V. 69. – P. 3038-3055.
301. Mazur, P. Causes of injury in frozen and thawed cells / P. Mazur // *Fed. Proc.* – 1965. – Vol. 24. – P. 175.
302. Mazur, P. The relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes / P. Mazur, W.F. Rall, N. Rigopoulos // *Biophys. J.* – 1981. – Vol. 36. – P. 653.
303. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications / P. Mazur // *Am. J. Physiol.* – 1984. – V. 247. – P. 125-142.
304. Mazur, P. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? / P. Mazur, C. Koshimoto // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 66. – № 5. – P. 1485-1490.
305. Mazur, P. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology / P. Mazur // *Cryobiology*. – 2010. – V. 60 (1). – P. 4-10.
306. Mizue, K. Studies on a scorpaneous fish *Sebasticus marmoratus* Cuvier et Valenciennes. VI. Electron-microscopic study of spermatogenesis / K. Mizue // *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* – 1968. – V. 25. – P. 9-24.
307. Morisawa, M. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility / M. Morisawa, K. Suzuki // *Science*. – 1980. – V. 210. – P. 1145-1147.

308. Morisawa, M. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes / M. Morisawa, K. Suzuki, S. Morisawa // J. Exp. Biol. – 1983. – V. 107. – P. 105-113.
309. Morisawa, M. Acquisition and initiation of sperm motility / M. Morisawa, S. Morisawa // Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. – P. 137-152.
310. Nelson, J.S. Fishes of the world / J.S. Nelson. – New York: John Wiley and Sons, 1984. – 523 p.
311. Nevzorov, A.N. Internal mechanism of metastable liquid water crystallization and its effects on intracloud processes / A.N. Nevzorov // Izvestiya. Atm. and Ocean Phys. – 2006. – V. 42. – № 6. – P. 765-772.
312. Nguyen, D.T. Intermolecular interaction studies of winter flounder antifreeze protein reveal the existence of thermally accessible binding state / D.T. Nguyen, M.E. Colvin, Y. Yeh, R.E. Feeney, W.H. Fink // Biopolymers. – 2004. – V. 75. – Iss. 2. – P. 109-117.
313. Nicander, L. Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa / L. Nicander // Comparative Spermatology. – Rome: Academia nazionale dei lincei, 1970. – P. 47-56.
314. Okamura, A. Spermatozoa of *Conger myriaster* observed by electron microscopy / A. Okamura, T. Motonobu // Zoolog. – 1999. – Sci. 16. – P. 927-933.
315. Orief, Y. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? / Y. Orief, K. Dafopoulos, A. Schultze-Mosgau, S. Al-Hasani // Middle East Fertil Soc J. – 2005. – V. 10 (3). – P. 171-184.
316. Pegg, D.E. Ice crystals in tissues and organs / D.E. Pegg // The Biophysics of Organ Cryopreservation. Plenum Publishing Corporation. – 1978. – P. 117-136.
317. Peñaranda, D.S. Protein profile study in European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma and its correlation with sperm quality / D.S. Peñaranda, F. Marco-Jiménez, L. Pérez, V. Gallego, I. Mazzeo, M. Jover, J.F. Asturiano // Journal of Applied Ichthyology. – 2003. – V. 26. – P. 746-752.

318. Peñaranda, D.S. Temperature affects the European eel spermiation modulating the testis steroidogenesis / D.S. Peñaranda, M. Morini, M.C. Vílchez, V. Gallego, I. Mazzeo, R.P. Dirks, G.E.E.J.M. Van den Thillart, H. Tveiten, L. Pérez, J.F. Asturiano // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 34-35.

319. Pérez, L. Effect of ionic modulators on sperm motility initiation in European eel sperm / L. Pérez, V. Gallego, M.C. Vílchez, L. Violi, M. Morini, R. Baeza, D.S. Peñaranda, J.F. Asturiano // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 38-39.

320. Petrunkina, A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology / A.M. Petrunkina // Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology. – 2007. – V. 4. – P. 78-91.

321. Pfaff, R.T. Water and DMSO membrane permeability characteristics of in-vivo- and in-vitro-derived and cultured murine oocytes and embryos / R.T. Pfaff, J. Liu, D. Gao, A.T. Peter, T.-K. Li, J.K. Critser // Mol. Human Reprod. – 1998. – V. 4. – № 1. – P. 51-59.

322. Pinart, E. Acrosin activity is a good predictor of boar sperm freezability / E. Pinart, M. Yeste, S. Bonet // Theriogenology. – 2015. – V. 83. – Iss. 9. – P. 1525-1533.

323. Piros, B. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa / B. Piros, J. Glogowski, R. Kolman, A. Rzemieniecki, J. Domagala, A. Horvath, B. Urbanyi, A. Ciereszko // Fish Physiol. Biochem. – 2002. – V. 26. – P. 289-295.

324. Poirier, G.R. Fine structure of testicular spermatozoa from the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* / G.R. Poirier, N. Nicholson // Journal of ultrastructure Research. – 1982. – V. 80. – P. 104-110.

325. Ponomareva, E.N. The development of cryobank to the gene pool and for the provision of aquaculture farms and hatcheries / E.N. Ponomareva, M.M. Belaya // Aquaculture Europe 2014. Abstracts. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014. – P. 1013-1014.

326. Prokopchuk, G. Control mechanisms of fish sperm activation: breaking some rules / G. Prokopchuk, J. Cosson, B. Dzyuba, O. Bondarenko, M. Rodina, O. Linhart // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013, Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 52-53.

327. Prokopchuk, G. Motility initiation of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa: Describing the propagation of the first flagellar waves / G. Prokopchuk, B. Dzyuba, O. Bondarenko, M. Rodina, J. Cosson // Theriogenology. – 2015. – V. 84. – Iss. 1. – P. 51-61.

328. Psenicka, M. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observation with scanning and transmission electron microscopy / M. Psenicka, M. Rodina, J. Nebesarova, O. Linhart // Theriogenology. – 2006. – V. 64. – P. 1355-1363.

329. Psenicka, M. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy / M. Psenicka, S.M.H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, J. Nebesarova, O. Linhart // Biol. Cell. – 2007. – V. 99. – P. 103-115.

330. Psenicka, M. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: A comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) / M. Psenicka, S.M.H. Alavi, M. Rodina, Z. Cicova, D. Gela, J. Cosson, J. Nebesarova, O. Linhart // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – V. 24. – P. 371-377.

331. Psenicka, M. Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization / M. Psenicka, M. Vancova, P. Koubek, J. Tesiteld, O. Linhart // Anim. Reprod. Sci. – 2009. – V. 111. – P. 3-16.

332. Psenicka, M. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy / M. Psenicka, M. Rodina, O. Linhart // *Animal Reproduction Science*. – 2010. – V. 117. – P. 147-154.
333. Psenicka, M. Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process / M. Psenicka, V. Kaspar, S.M.H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, P. Li, S. Borishpolets, J. Cosson, O. Linhart, A. Ciereszko // *J. Appl. Ichthyol.* – 2011. – V. 27. – P. 678-682.
334. Quinn, P. Vitrification of human oocytes with different tools / P. Quinn // *Fertility Cryopreservation*. – New York: Cambridge University Press, 2010. – P. 131-143.
335. Radhakrishnan, R. Nucleation of Crystalline Phases of Water in Homogeneous and Inhomogeneous Environments / R. Radhakrishnan, B.L. Trout // *Phys. Rev. Lett.* – 2003. – V. 90. – P. 158301.
336. Rikmenspoel, R. Biophysical approaches to the measurement of sperm motility / R. Rikmenspoel // *Spermatozoan motility*. Publ. №72. – Washington, D.C.: Amer. Assoc. advanc. sci., 1962. – P. 31-54.
337. Robles, V. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures / V. Robles, V. Barbosa, M.P. Herráez, S. Martínez-Páramo, M.L. Cancela // *Theriogenology*. – 2007. – V. 68. – Iss. 2. – P. 284-289.
338. Rud, R.B. Cryopreservation for aquatic species / R.B. Rud, C.G. Lutz // *Aquaculture magazine*. – 2015. – V. 41. – № 1. – P. 36-40.
339. Sanches, E.A. Sperm motility of the *Steindachneridion parahybae* during the time after activation / E.A. Sanches, R.Y. Okawara, D. Caneppele, E. Romagosa // *Aquaculture Europe 2014. Abstracts*. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014. – P. 1151-1152.
340. Saragusty, J. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification / J. Saragusty, A. Araw // *Reproduction*. – 2011. – V. 141. – P. 1-19.

341. Seki, S. The temperature and type of intracellular ice formation in preimplantation mouse embryos as a function of the developmental stage / S. Seki, P. Mazur // *Biol. Reprod.* – 2010. – Vol. 82 (6). – P. 1198-1205.
342. Spindler, R. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation / R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher // *Cryobiology.* – 2012. – Vol. 64 (3). – P. 250-260.
343. Stein, H. Licht- und electronenoptische Untersuchungen an den spermatozoen verchiedener verschiedener Süßwasser knochenfische (Teleostei) / H. Stein // *Zeitschrift fur Angewandte Zoologie.* – 1981. – V. 68. – P. 183-198.
344. Stoss, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology / J. Stoss // *Fish Physiol.* – New York: Academic Press, 1983. – Part B. – V. 9. – P. 305.
345. Strambini, G.B. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding / G.B. Strambini, E. Gabellieri // *Biophys J.* – 1996. – V. 70 (2). – P. 971-976.
346. Taylor, M. Vitrification in tissue preservation / M. Taylor, Y. Song, K. Brockbank // *Life in the Frozen State.* – Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004. – P. 603-641.
347. Thirumala, S. Freezing and post-thaw apoptotic behaviour of cells in the presence of palmitoyl nanogold particles / S. Thirumala, J.M. Forman, W.T. Monroe, R.V. Devireddy // *Nanotechnology.* – 2007. – V. 18. – P. 195104-195115.
348. Todd, P.R. Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (*Anguillidae*) / P.R. Todd // *Cell Tissue Res.* – 1976. – V. 171. – P. 221-232.
349. Toner, M. Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos / M. Toner, E.G. Cravalho, J. Stachecki, T. Fitzgerald, R.G. Tompkins, M.L. Yarmuch, D.R. Armant // *Biophys. J.* – 1993. – Vol. 64. – P. 1980-1921.
350. Toth, G.P. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions / G.P. Toth, A. Ciereszko, S.A. Christ, K. Dabrowski // *Aquaculture.* – 1997. – V. 154. – P. 337-348.

351. Vaida, T. Cryo-bioorganic chemistry: molecular interactions at low temperature / T. Vaida // Cell. Mol. Life Sci. – 1999. – V. 56. – P. 398-414.

352. Valdebenito, I. Effects of pH, osmolarity and temperature on black conger eel sperm motility (*Genypterus maculatus*) (Tschudi, 1846) cultured under lab conditions / I. Valdebenito, C. Lozano, C. Moreno, J.M. Estrada, A. Ramirez, D. Ramirez, A. Ubilla // 3rd International Workshop on the of Fish Gametes. Final Programme and Book of Abstracts. Budapest, Hungary, September 7-9. – 2011. – P. 123-124.

353. Vílchez, M.C. Identification of major proteins from the seminal plasma of hormoneinduced sexual mature european eels (*Anguilla anguilla*). Correlation with sperm quality / M.C. Vílchez, D. Pla, V. Gallego, L. Sanz, L. Pérez, J.F. Asturiano, J.J. Calvete, D.S. Peñaranda // Aquaculture Europe 2014. Abstracts. Donostia – San Sebastian, October 14-17, 2014. – P. 970-971.

354. Wei, Q. Ultrastructure and morphology of spermatozoa in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray 1835) using scanning and transmission electron microscopy / Q. Wei, P. Li, M. Psenicka, S.M.H. Alavi, L. Shen, J. Liu, J. Peknicova, O. Linhart // Theriogenology. – 2007. – V. 67. – P. 1269-1278.

355. Whittingham, D.G., Principles of embryo preservation / D.G. Whittingham // Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. – Kent, Tunbridge Wells: Pitman Medical Lts., 1980. – P. 65.

356. Wowk, B. Thermodynamic aspects of vitrification / B. Wowk // Cryobiology. – 2010. – V. 60. – P. 11-22.

357. Xu, Y. The process of fertilization of *Acipenser sinensis* Grey observed by SEM / Y. Xu, Q. Xiong // Acta Zool. – 1988. – V. 34. – P. 325-328.

358. Yu, Z.-W. The effect of dimethyl sulphoxide on the structure and phase behavior of palmitoleoylphosphatidylethanolamine / Z.-W. Yu, P.J. Quinn // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1509. – P. 440-450.

359. Zhang, T. Cryopreservation of fish gametes and its applications / T. Zhang // 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 17-20 Sept. 2013,

Albufeira, Portugal. Book of Abstracts. Printed in Faro, Portugal. Editors: Martínez-Páramo S., Oliveira C.C.V., Dinis M.T. – 2013. – P. 114-115.

360. Zhmakin, A.I. Fundamentals of cryobiology / A.I. Zhmakin – Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009. – 278 p.

361. Zinchenko, Y. Use of Directional Solidification to Quantify the Thermophysical Properties of DMSO-based Cryoprotectant Solutions / Y. Zinchenko, E. Laureano, R.B. Coger // Cell Preserv. Technol. – 2004. – V.2. – Iss. 4. – P. 276-289.

362. Zirkin, B.R. The ultrastructure of nuclear differentiation during spermiogenesis in the salmon / B.R. Zirkin // Journal of the Ultrastructure Research. – 1975. – V. 50. – P. 174-184.